

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENISE NAOMI XAVIER SALMON

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E
FORMULAÇÃO DE FITASE TERMOESTÁVEL DE *Ganoderma* sp. MR-56 OBTIDA POR
CULTIVO SUBMERSO

CURITIBA
2015

DENISE NAOMI XAVIER SALMON

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO,
RECUPERAÇÃO E FORMULAÇÃO DE FITASE TERMOESTÁVEL DE *Ganoderma*
sp. MR-56 OBTIDA POR CULTIVO SUBMERSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Michele Rigon Spier
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Luciana P.S. Vandenberghe

CURITIBA

2015

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S176d

Salmon, Denise Naomi Xavier

Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, recuperação e formulação de fitase termoestável de *Ganoderma* sp. MR-56 obtida por cultivo submerso / Denise Naomi Xavier Salmon. – Curitiba, 2015.
202 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015.

Orientador: Michele Rigon Spier – Coorientador: Carlos Ricardo Soccol
– Coorientador: Luciana Porto de Souza Vandenberghe.
Bibliografia: p. 161-191.

1. Enzimas. 2. Fitases. 2. *Ganoderma*. 3. Spray-drying. 4. Secagem por congelamento. I. Universidade Federal do Paraná. II. Spier, Michele Rigon. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Vandenberghe, Luciana Porto de Souza. V. Título.

CDD: 660.63

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação
Setor de Tecnologia
Programa Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de Denise Naomi Xavier Salmon intitulada: "Desenvolvimento de um Bioprocessos para a produção, recuperação e formulação de fitase termoestável de *ganoderma sp.* mr-56 obtida por cultivo submerso", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação do Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e a pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 12 de Fevereiro de 2015.

Profª Drª Michele Rigon Spier
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Avaliador Interno (UFPR)

Profª Drª Franciny Campos Schmidt
Avaliador Interno (UFPR)

Profª Drª Maria Rosa Machado Prado
Avaliador Externo (FPP)

Prof. Dr. Vitor Renan da Silva
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Clara e Odenis Salmon, pelo amor, motivação, por sempre me apoiarem e pela família maravilhosa que temos.

Aos meus amigos queridos que sempre serão especiais e que fazem parte da minha vida nos melhores e piores momentos, Anna Dickow, Siliane Berté, Alfredo Walter, Felipe Brisk, Vanessa Ghiggi, Giovana Boff, Carolina Perottoni e Sidnei Bordignon. Em especial aos queridos amigos do laboratório Mitiyo F. Miyaoka, Maria Rosa M. Prado, Michelle C. T. Batista, Márcio Vasconcelos, Fernanda Vasconcellos, Valesca W. Montibeller, Maria Alejandra Cruz, Tania Campioni e Joana Rizzolo, Mário C. J. Bier, pela amizade, horas de trabalho na alegria e na tristeza e muitos cafés e risadas. Aos colegas do laboratório Ricardo C. Fendrich, Francisco Vítola, Caroline T. Yamaguishi, Denise Kitamura, Ana Maria Finco, Keli Sobral, Cassiano Silva, Mara E. Matos, Gilberto Melo, André Lopes, Juliana Oliveira e Suzan Rossi.

À Profa. Dra. Michele Rigon Spier, em especial, pela sua orientação. À Profa. Dra. Luciana P.S. Vandenberghe e ao Prof. Dr. Carlos R. Soccol pela co-orientação e suporte em etapas importantes e decisões desta tese. À Profa. Dra. Adriane B. P. Medeiros, Profa. Dra. Adenise L. Woiciechowski e Prof. Dr. Luiz A. Letti pela ajuda em etapas específicas da pesquisa.

À Dra. Vincenza Faraco pela oportunidade da participação como pesquisadora visitante no projeto BIOASSORT (318931) realizado na Itália, cidade de Nápoles, na Universidade de Nápoles “*Federico II*” no grupo de Biotecnologia Industrial, Ambiental e Molecular (*BIMA Group*). A pesquisa foi financiada pela *European Commission Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme within the 7th European Community Framework Programme*. Título do projeto: “*Improvement of technologies and tools, e.g. biosystems and biocatalysts, for waste conversion to develop an assortment of high added value eco-friendly and cost-effective bio-products*”.

Às queridas e especiais amigas Sajna Kuttuvan Valappil e Lalitha Devi Gottumukkala que tive o prazer de conviver na Itália e também oportunidade de compartilhar o conhecimento.

À CAPES REUNI e CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A presente tese teve como objetivo a produção de fitase termoestável de *Ganoderma* sp. MR-56 empregando o extrato de farelo de trigo, um subproduto agroindustrial, como substrato para o cultivo submerso. As fitases são enzimas comumente utilizadas em processamento de ração animal e alimentos para catalisar a degradação do ácido fítico em inositol e fosfatos. O ácido fítico é considerado um fator anti-nutricional presente nos vegetais, pois diminui a biodisponibilidade de alguns nutrientes em aves e suínos. Dessa forma, a aplicação da fitase reduz a adição de fosfato inorgânico nas rações, consequentemente, um benefício econômico e a diminuição da excreção desse mineral no meio ambiente. Atualmente as fitases produzidas industrialmente têm origem microbiana e são obtidas por processos fermentativos. Porém, a produção de fitases de microrganismos ainda é limitada e por cultivos submersos nunca reportados na literatura até o presente estudo. A tese teve como objetivo identificar o micro-organismo produtor de fitase e otimizar a produção da enzima. Além disso, a recuperação, caracterização, formulação e o estudo da estabilidade da enzima também foram realizados. O *Ganoderma* sp. foi identificado por métodos morfológico e molecular. A otimização da produção de fitase foi constituída por 2 etapas: a primeira consistiu em um delineamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para estudar a suplementação do meio de cultivo com melaço de soja, extrato de levedura e cloreto de cálcio. A segunda etapa da otimização foi constituída de um DCCR e os fatores estudados foram temperatura de cultivo, pH inicial e taxa de inoculação. O meio de cultivo otimizado continha extrato de levedura 8% m/v, temperatura de 30°C, pH 6,0 e taxa de inoculação de 3% v/v e a produção máxima de fitase foi de 14,5 U mL⁻¹. Nos estudos de cultivo submerso em diferentes tipos de biorreatores, o frasco tipo Dreschel com 2 vvm resultou na melhor produção da enzima de 20,94 U mL⁻¹, porém o STR alcançou uma melhor produtividade de fitase de 0,14 U⁻¹mL⁻¹h⁻¹. A concentração por ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos com poro de 30 kDa apresentou maior concentração da enzima em 36,75 vezes. As estratégias de purificação de cromatografia de troca iônica, filtração em gel S-100 e S-400 não foram eficientes para a separação da fitase. Por outro lado, o zimograma indicou bandas com atividade de fitase as quais apresentaram elevada massa molecular. A fitase foi caracterizada e apresentou pH ótimo entre 4,5 e 5,0, e adequada termoestabilidade à 80 e 90°C/30 min com 100 e 94,24% de atividade residual, respectivamente. A fitase foi ativada por Mn²⁺, Ca²⁺, Na⁺, Co²⁺, Fe²⁺, EDTA e fosfato inorgânico na concentração de 1 mM. Após seriados estudos de formulação líquida com emprego de aditivos, verificou-se que a presença do antimicrobiano A1 0,21% e antioxidante O2 0,0021% foram importantes para a manutenção da estabilidade da enzima durante o armazenamento (103,5% de atividade relativa) em 15 dias em condições aceleradas (40°C). Os estudos de armazenamento à temperatura ambiente da fitase em pó resultaram que o polímero E2 apresentou 79% de atividade residual após 90 dias de estudo. A fitase produzida e formulada apresentou um potencial para possível aplicação em ração animal e produtos para consumo humano com o intuito de diminuir o fitato, bem como melhorar a absorção de alguns nutrientes.

Palavras-chave: fitase, *Ganoderma* sp. MR-56, otimização, concentração, formulação, aditivos e *spray-drying*.

ABSTRACT

The aim of this thesis was the production of a thermostable phytase from *Ganoderma* sp. MR-56 by submerged culture, using wheat bran extract as agro-industrial by-product. Phytases are enzymes employed in processing feed and food to catalyze the degradation of phytic acid to inositol and phosphates. The phytic acid is considered an antinutritional factor present in vegetables and decreases the bioavailability of some nutrients in poultry and pigs. The phytase application reduces the inorganic phosphate addition on feed, therefore, an economic benefit and diminished excretion of this mineral into the environment. Currently, phytases from microbial source have been obtained by industrial fermentation processes. However, phytases production by macromycetes is still limited and by submerged culture production had never been reported before in the literature. This thesis aims to identify the microorganism producing phytase and optimize enzyme production by submerged culture. In addition, recovery, characterization, formulation and stability studies of phytase were performed. The *Ganoderma* sp. was identified by morphological and molecular methods. The optimization of phytase bioprocess was composed by two steps: the first consisted of an experimental design CCRD two levels and three factors to study the submerged culture medium supplementation composed of soybean molasses, yeast extract and calcium chloride. The second optimization consisted of CCRD and the factors studied were culture temperature, initial pH and inoculum rate. The optimized medium contained 8% w/v yeast extract, temperature of 30°C, pH 6.0 and 3% v/v inoculum rate and the maximum phytase production reached 14.5 U mL⁻¹. Studies of different bioreactors for phytase synthesis, the Dreschel bottle type with 2 vvm was the best for enzyme production (20.94 U mL⁻¹), however in STR reached the best phytase productivity of 0,14 U⁻¹mL⁻¹h⁻¹. The ultrafiltration tubes using 30 kDa fraction retained was 36.75-fold of concentrated enzyme. Strategies purification, of ion exchange chromatography, gel filtration S-100 and S-400 were not effective for the phytase separation. Phytase zymogram suggested activity bands with estimated high molecular weight. The enzyme was characterized and had optimum pH of 5.0 and a thermo stability phytase at 80 to 90°C for 30 min showed 100 and 94.24% of residual activity, respectively. The enzyme was activated by Mn²⁺, Ca²⁺, Na⁺, Co²⁺ and Fe²⁺, EDTA and inorganic phosphate at concentrations of 1 mM. After series of studies for phytase liquid formulation additives, it was found that the antimicrobial 0.21% A1 and antioxidant 0.0021% O2 were important to maintain enzyme stability during storage 103.5% phytase residual activity on 15 days at 40°C. The formulation powder studies allowed select the polymer E2 for phytase encapsulation with 79% phytase activity relative at room temperature after 90 days of storage. The produced and formulated phytase presented a potential application for feed and processed food in order to reduce the phytate as well as improving some nutrients absorption.

Keywords: phytase, *Ganoderma* sp., optimization, concentration, formulation, additives and spray-drying.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - MECANISMO DE HIDRÓLISE PELA ENZIMA FITASE	28
FIGURA 2 – BASIDIOMA DE <i>GANODERMA</i> SP	41
FIGURA 3 - ESPÉCIES DE <i>GANODERMA</i> SP.	42

CAPÍTULO III ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE	66
FIGURA 5 – A: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SUBMERSO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE POR <i>GANODERMA</i> SP. MR-56. B: ESTUDO DE SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO DURANTE O CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR <i>GANODERMA</i> SP. MR-56	71
FIGURA 6 – A: ESTUDO DE SUPLEMENTAÇÃO DE MINERAIS E DO POLÍMERO NO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR <i>GANODERMA</i> SP. MR-56. B: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FITASE DURANTE O CULTIVO SUBMERSO DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56.....	73
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA APRESENTANDO A REGIÃO ÓTIMA DA INFLUÊNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE FITASE	78
FIGURA 8 - ESTUDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA NO MEIO DE CULTIVO SUBMERSO DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 PARA A PRODUÇÃO DE FITASE	78
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA COM A REGIÃO ÓTIMA DE ATIVIDADE DE FITASE COM OS VALORES DA TEMPERATURA E PH	82

CAPÍTULO IV ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREATORES

FIGURA 10 – A: FRASCO TIPO DRESCHER COM INJEÇÃO DE AR PARA PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO. B: SISTEMA DE BIORREATORES TIPO DRESCHER COM INJEÇÃO DE AR PARA PRODUÇÃO DE FITASE	89
--	----

FIGURA 11 – BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO (STR) UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO	90
FIGURA 12 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	93
FIGURA 13 - PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (VVM)	95
FIGURA 14 - PERFIL DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM STR.....	97

CAPÍTULO V SEPARAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE RECUPERAÇÃO DA FITASE	105
FIGURA 16 – A: SISTEMA DE MICROFILTRAÇÃO COM CARTUCHO DE POROSIDADE 0,1 μ M (1) ALIMENTAÇÃO DA AMOSTRA; (2) FRAÇÃO RETIDA; (3) FRAÇÃO PERMEADA MICROFILTRADA; B: SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL QUIXSTAND	106
FIGURA 17 - ULTRAFILTRAÇÃO EM DISPOSITIVOS DE CENTRIFUGAÇÃO EM TUBOS DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO CULTIVO SUBMERSO DE <i>GANODERMA</i> . SP. MR-56 PARA CONCENTRAÇÃO DA FITASE.....	115
FIGURA 18 – A: DENSIDADE ÓPTICA D.O. LINHA AZUL A 280 NM, D.O. LINHA VERMELHA A 220 NM, LINHA AZUL GRADIENTE SALINO %, LINHA VERDE GRADIENTE SALINO EM MOLAR. B: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA ATIVIDADE DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 NAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA RESINA MONO Q	117
FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO (D.O. 280 NM E ATIVIDADE FITÁSICA) DURANTE A CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (<i>SEPHACRYL</i> S-100)	118
FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO DURANTE A CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL EM COLUNA <i>SEPHACRYL</i> S-400	119
FIGURA 21 - SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56.....	120
FIGURA 22 - GEL NATIVO DO ZIMOGRAMA DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56.....	121
FIGURA 23 – A: EFEITO DE DIFERENTES VALORES DE PH PARA A DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56. B: EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA ATIVIDADE DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. C: EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS METÁLICOS (1mM) NA ATIVIDADE DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. D: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO INORGÂNICO NA ATIVIDADE DE FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. E: GRÁFICO DE LINEARIZAÇÃO POR LINEWEAVER BURK PARA A DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES K_M E V_{MAX} DA FITASE DE	

<i>GANODERMA</i> SP. MR-56. F: INATIVAÇÃO TÉRMICA DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56 À 50°C	123
--	-----

CAPÍTULO VI FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA E EM PÓ

FIGURA 24 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE.	132
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CODIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE ADITIVOS ANTIMICROBIANOS, ESTABILIZANTES (SAIS E AÇÚCARES), POLÍMEROS, ANTIOXIDANTES, ACIDULANTES E PROTEÍNA / ÁLCOOL	134
FIGURA 26 - ESTUDO DOS ADITIVOS NO CONCENTRADO ENZIMÁTICO ARMAZENADO À 40 °C POR 15 DIAS.....	143
FIGURA 27 - DIAGRAMA DE PARETO COM OS EFEITOS DOS ADITIVOS PRINCIPAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	145
FIGURA 28 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS A1, O2 E S1 NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40 °C	148
FIGURA 29 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROPARTÍCULAS DA FORMULAÇÃO CONTENDO O POLÍMERO E1: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES.....	154
FIGURA 30 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E2: A- AUMENTO 350 VEZES; B- AUMENTO DE 1000 VEZES; C- AUMENTO DE 3000 VEZES; D- AUMENTO DE 7000 VEZES.....	154
FIGURA 31 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E3: A- AUMENTO 350 VEZES; B- AUMENTO DE 1000 VEZES; C- AUMENTO DE 3000 VEZES; D- AUMENTO DE 7000 VEZES.....	155
FIGURA 32 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E4: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES.....	155
FIGURA 33 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E5: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES.....	156

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO FÍTICO E FÓSFORO DISPONÍVEL (%) DOS VEGETAIS	26
TABELA 2 - PRODUÇÃO DE FITASES FÚNGICAS DE FSM REPORTADAS NA LITERATURA.....	32
TABELA 3 - PRINCIPAIS FITASES COMERCIAIS DISPONÍVEIS NO MERCADO	34
TABELA 4 - ETAPAS DE PURIFICAÇÃO E ALGUNS DADOS SOBRE CARACTERIZAÇÃO DE FITASES PROVENIENTES DE MACROMICETOS REPORTADAS NA LITERATURA	49
TABELA 5 - ESTUDOS SOBRE A ADIÇÃO DE ADITIVOS NA ESTABILIDADE DE ENZIMAS RELATADOS NA LITERATURA.....	51

CAPÍTULO II IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ganoderma* sp. MR-56 PRODUTOR DE FITASE

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO CTAB 2% DE EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>GANODERMA</i> SP.	56
TABELA 7 - RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DE <i>GANODERMA</i> SP	60

CAPÍTULO III ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO

TABELA 8 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA, EXTRATO DE LEVEDURA E CaCl_2 DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR.....	68
TABELA 9 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E TAXA DE INOCULAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR.....	69
TABELA 10 - RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE (U mL^{-1}) UTILIZANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2 ³	76
TABELA 11 - ANOVA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2 ³ PARA AS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA, EXTRATO DE LEVEDURA E CaCl_2	76
TABELA 12 - VITAMINAS DO EXTRATO DE LEVEDURA EM PÓ DA MARCA HIMEDIA RM027	78
TABELA 13 - AMINOÁCIDOS PRESENTES NO EXTRATO DE LEVEDURA EM PÓ DA MARCA HIMEDIA RM027	80
TABELA 14 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2 ³ , APRESENTANDO OS RESULTADOS DOS 18 EXPERIMENTOS QUE ESTUDAM A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES pH, TEMPERATURA DE CULTIVO (°C) E TAXA DE INOCULAÇÃO (%) NA VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DE FITASE.....	81

TABELA 15 - ANOVA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR PARA AS VARIÁVEIS TEMPERATURA, pH E TAXA DE INOCULAÇÃO	82
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE TRIGO. 84	

CAPÍTULO IV ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREATORES

TABELA 17 - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO OBTIDOS EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	99
TABELA 18 - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO OBTIDOS EM STR.....	99

CAPÍTULO V SEPARAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56

TABELA 19 - RESULTADOS DOS ESTUDOS DE PRECIPITAÇÃO POR SAIS E PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTE DA FITASE DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56	114
TABELA 20 - RESULTADOS DAS ETAPAS DE MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE <i>GANODERMA</i> SP. MR-56	116
TABELA 21 - IDENTIFICAÇÃO DOS <i>POOLS</i> DAS FRAÇÕES DE D.O. A 280 NM DA CROMATOGRAFIA EM GEL <i>SEPHACRYL</i> S-100	118

CAPÍTULO VI FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA E EM PÓ

TABELA 22 - ESTUDO PRELIMINAR DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CLASSES DE ADITIVOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA EM TEMPERATURA DE 50°C POR 30 MINUTOS.....	133
TABELA 23 - FATORES E NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS USADOS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN <i>SCREENING DESIGN</i> 11/12 PARA A AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS ADITIVOS NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40°C	135
TABELA 24 - MATRIZ DO PLACKETT-BURMAN <i>SCREENING DESIGN</i> 11/12 PARA ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS ADITIVOS NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA	135
TABELA 25 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS NO CONCENTRADO ENZIMÁTICO	136
TABELA 26 - INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS SOBRE A ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA À 50°C POR 30 MINUTOS	140
TABELA 27 - FORMULAÇÕES COM AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS DO PLANEJAMENTO PB	145
TABELA 28 - RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PELO DELINEAMENTO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS A1, O2 E S1 NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE.....	147

TABELA 29 - RESULTADOS DOS TESTES DE SECAGEM DA FITASE EM <i>SPRAY DRYER</i> UTILIZANDO DIFERENTES POLÍMEROS ENCAPSULANTES	149
TABELA 30 - RESULTADOS DA UMIDADE DAS AMOSTRAS FORMULADAS EM PÓ CONTENDO OS POLÍMEROS TESTADOS E1, E2, E3, E4 E E5 APÓS A SECAGEM EM <i>SPRAY DRYER</i> E APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40°C.....	151
TABELA 31 - RENDIMENTOS DO PROCESSO DE SECAGEM EM <i>SPRAY DRYER</i> DAS FORMULAÇÕES DE FITASE EM PÓ	152
TABELA 32 - ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES EM PÓ CONTENDO DIFERENTES POLÍMEROS POR SECAGEM EM <i>SPRAY DRYER</i> , ARMAZENADAS EM CONDIÇÕES ACELERADAS (40 °C) DURANTE DE 0, 7 E 15 DIAS.....	157
TABELA 33 - ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES EM PÓ ARMAZENAMENADAS À TEMPERATURA AMBIENTE (26±3 °C) DURANTE 0, 30, 60 E 90 DIAS	159

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
Atm	- Atmosfera
CTAB	- Brometo de cetil-trimetil-amônio
DCCR	- Delineamento Composto Central Rotacional
dNTP	- <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
D.O.	- Densidade óptica
E.C.	- <i>Enzyme Comission</i>
DNS	- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
FES	- Fermentação no estado sólido
FSm	- Fermentação submersa
g	- Grama
FPLC	- <i>Fast Performace Flow Chromatography</i>
kDa	- Kilodalton
Km	- Constante de Michaelis Menten
L	- Litros
ln	- Logaritmo neperiano
M	- Molar
m/v	- Massa por volume
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
min	- Minutos
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar
NRRL	- <i>Northern Regional Research Laboratory (Culture collection, USA)</i>
P	- Fósforo

PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	- Plackett-Burman
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PDA	- Potato dextrose ágar
PEG	- Polietilenoglicol
<i>Pool</i>	- Grupo de amostras/enzimas
psi	- <i>Pound force per square inch</i> (unidade de pressão)
rpm	- Rotações por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
STR	- <i>Stirred tank reactor</i> (biorreator de tanque agitado)
Tris	- Hidroximetil aminometano
U mL ⁻¹	- Unidade de atividade enzimática por mililitros
U g ⁻¹	- Unidade de atividade enzimática por grama na base seca
UV	- Ultravioleta
V _{máx}	- Velocidade máxima, máximo de velocidade inicial quando todos os sítios ativos da enzima estão ocupados
v/v	- Volume por volume
vvm	- Volume de ar por volume de meio por minuto
µm	- Micrômetro
µL	- Microlitro
4-MUP	- 4-metil umbeliferil fosfato
4-MU	- 4-metilumbeliferona

LISTA DE SÍMBOLOS

β	- Beta
%	- Por cento
®	- Marca registrada
TM	- <i>Trade Mark</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Objetivo geral	23
1.1.2 Objetivos específicos	23
1.1.3 Divisão dos capítulos	24

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 FITATO.....	26
2.2 FITASES.....	27
2.2.1 Definição e classificação das fitases.....	27
2.2.2 Fontes de fitases.....	29
2.2.3 Produção de fitases	30
2.2.4 Mercado mundial das fitases	32
2.2.5 Fitases comerciais	33
2.3 CONDIÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS PARA A PRODUÇÃO DE FITASE.....	34
2.3.1 Fontes de carbono	35
2.3.2 Fontes de nitrogênio	36
2.3.3 Fontes de fósforo	36
2.3.4 Agitação e aeração em FSm.....	38
2.3.5 pH.....	38
2.3.6 Temperatura.....	39
2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR MACROMICETOS	39
2.5 <i>Ganoderma</i> sp.....	40
2.6 APLICAÇÕES DAS FITASES	42
2.6.1 Indústria de ração animal.....	42
2.6.2 Indústria de alimentos	44
2.6.3 Indústria de cosméticos	45
2.6.4 Agricultura	45
2.6.5 Meio ambiente.....	46
2.7 RECUPERAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASE	46
2.8 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA.....	49

CAPÍTULO II IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ganoderma* sp. MR-56 PRODUTOR DE FITASE

1 INTRODUÇÃO.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO	54

2.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	55
2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	55
2.3.1 Amplificação das regiões ITS 1 e ITS 2 do rDNA	56
2.3.2 Purificação de DNA para reação de sequenciamento	57
2.3.3 Sequenciamento de DNA.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.1 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA.....	58
3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	59
3.2.1 Análise de sequenciamento de DNA.....	59
4 CONCLUSÃO	60
 CAPÍTULO III ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>Ganoderma</i> sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO	
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 MICRO-ORGANISMO	63
2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO SUBMERSO	63
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA CULTIVO SUBMERSO.....	64
2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO.....	64
2.5 PRODUÇÃO DE FITASES POR CULTIVO SUBMERSO.....	64
2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FITASE	65
2.7 FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE.....	65
2.7 ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA O CULTIVO SUBMERSO.....	66
2.7.1 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de carbono	66
2.7.2 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio.....	66
2.7.3 Avaliação da suplementação de minerais e do polímero PEG no cultivo submerso	67
2.8 ESTUDO DA TAXA DE INOCULAÇÃO	67
2.9 OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO	67
2.9.2 Determinação da melhor concentração de extrato de levedura	68
2.9.3 Otimização dos parâmetros físico e químicos para a produção de fitase por cultivo submerso	68
2.10 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DO FARELO DE TRIGO	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1 ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA O CULTIVO SUBMERSO.....	69
3.1.1 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de carbono	69
3.1.2 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio.....	71

3.1.3 Avaliação da suplementação de minerais e do polímero PEG no cultivo submerso	72
3.2 ESTUDO DA TAXA DE INOCULAÇÃO	73
3.3 OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO	74
3.3.1 Otimização da suplementação do meio para a produção de fitase em cultivo submerso	74
3.3.2 Determinação da melhor concentração de extrato de levedura	78
3.3.3 Otimização dos parâmetros físico-químicos para a produção de fitase por cultivo submerso	80
3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DO FARELO DE TRIGO	83
4 CONCLUSÃO	84
 CAPÍTULO IV ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE <i>Ganoderma</i> sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREATORES	
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1 MICRO-ORGANISMO	87
2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO SUBMERSO	88
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA CULTIVO SUBMERSO	88
2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO	88
2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FITASE	88
2.6 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	88
2.7 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA	89
2.8 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO	89
2.9 ANÁLISES	91
2.10 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	92
3.2 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA	94
3.3 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO	96
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO	98
4 CONCLUSÃO	99

CAPÍTULO V SEPARAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56

1 INTRODUÇÃO	102
2 MATERIAL E MÉTODOS	104
2.1 MICRO-ORGANISMO	104
2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO PARA O CULTIVO SUBMERSO	104
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA O CULTIVO SUBMERSO	104
2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO	104
2.5 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO	104
2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	105
2.7 FLUXOGRAMA DA SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA FITASE	105
2.7.1 Centrifugação do extrato bruto enzimático	106
2.7.2 Clarificação do extrato bruto enzimático por microfiltração	106
2.7.3 Métodos de purificação de baixa resolução	106
2.7.3.1 Precipitação com sulfato de amônio (<i>Salting out</i>)	106
2.7.3.2 Precipitação com solvente (acetona)	107
2.7.3.3 Ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos	107
2.7.3.4 Ultrafiltração tangencial (QuixStand)	107
2.7.4 Métodos de purificação de alta resolução	108
2.7.4.1 Cromatografia de troca iônica	108
2.7.4.2 Cromatografia de filtração em gel <i>Sephacryl S-100</i>	108
2.7.4.3 Cromatografia de filtração em gel <i>Sephacryl S-400</i>	109
2.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	109
2.9 LIOFILIZAÇÃO	109
2.10 SDS-PAGE	109
2.11 ZIMOGRAMA DA FITASE	110
2.12 CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE <i>Ganoderma sp.</i> MR-56	110
2.12.1 Estudo do efeito do pH na atividade da fitase	110
2.12.2 Estudo do efeito da temperatura na atividade da fitase	111
2.12.3 Estudo da influência dos íons metálicos e edta na atividade da fitase	111
2.12.4 Estudo da influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase	111
2.12.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima ($v_{máx}$) e afinidade enzima-substrato	111
2.12.6 Determinação da constante de velocidade de reação (k), meia vida da enzima e estabilidade térmica da fitase	112
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.1 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO	113
3.1.1 Clarificação do extrato bruto enzimático por microfiltração	113
3.1.3 Ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos	114
3.1.4 Ultrafiltração tangencial (QuixStand)	115
3.2 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO	116

3.2.1 Cromatografia de troca iônica	116
3.2.2 Cromatografia de filtração em gel <i>Sephacryl</i> S-100	117
3.2.3 Cromatografia de filtração em gel <i>Sephacryl</i> S-400	118
3.3 SDS-PAGE	119
3.4 ZIMOGRAMA DA FITASE	120
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE <i>Ganoderma</i> sp. MR-56	121
3.5.1 Efeito do ph na atividade da fitase	121
3.5.2 Efeito da temperatura na atividade da fitase.....	122
3.5.3 Efeito dos íons metálicos e edta na atividade da fitase	124
3.5.4 Estudo da influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase.....	124
3.5.5 Determinação das constantes de michaelis-menten (k_m), velocidade máxima ($v_{máx}$) e afinidade enzima-substrato	125
3.5.6 Estudos da inativação enzimática, determinação da constante k e meia vida da enzima.....	125
4 CONCLUSÃO	126
CAPÍTULO VI FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA E EM PÓ	
1 INTRODUÇÃO.....	128
2 MATERIAL E MÉTODOS	130
2.1 MICRO-ORGANISMO	130
2.2 PRODUÇÃO DE FITASE	130
2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	130
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FITASE	131
2.5 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA.....	131
2.5.1 Estudo de estabilidade em condição acelerada.....	131
2.5.2 Legislação	131
2.5.3 Primeira etapa: Estudo preliminar da influência de diferentes aditivos durante a reação enzimática	132
2.5.4 Segunda etapa: Seleção dos aditivos para formulação líquida	133
2.5.5 Terceira etapa: estudo da combinação de aditivos (A1, C2, U3, T1, T2, O2 e S1) na formulação líquida	134
2.5.6 Quarta etapa: Definição da concentração dos aditivos selecionados A1, O2 e S1 na formulação da fitase na forma líquida.....	135
2.6 FORMULAÇÃO DA FITASE EM PÓ	136
2.6.1 Secagem em <i>Spray Dryer</i>	137
2.6.2 Análises das formulações em pó	137
2.6.2.1 Análise de umidade das formulações em pó	137
2.6.2.2 Rendimento das formulações de fitase em pó obtidas por secagem em <i>spray dryer</i>	137

2.6.2.3 Análise da Estabilidade da Atividade Enzimática nas Formulações em pó	137
2.6.2.4 Análise das formulações de fitase em pó em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	138
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
3.1 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA	138
3.1.1 Primeira etapa: Estudo preliminar da influência de diferentes aditivos durante a reação enzimática	138
3.1.2 Segunda etapa: Seleção dos aditivos para formulação líquida	140
3.1.3 Terceira etapa: estudo da combinação de aditivos (A1, C2, U3, T1, T2, O2 e S1) na formulação líquida	144
3.1.4 Quarta etapa: definição da concentração dos aditivos A1, O2 e S1 na formulação líquida	145
3.1.5 Estudo da estabilidade da atividade fitásica na formulação líquida em condições aceleradas	148
3.2 FORMULAÇÃO DA FITASE EM PÓ	148
3.2.1 Secagem em <i>Spray Dryer</i>	148
3.2.2 Análise de Umidade das Formulações em Pó	149
3.2.3 Rendimento das formulações de fitase em pó obtidas por secagem em <i>spray dryer</i>	151
3.2.4 Análise das formulações de fitase em pó em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	152
3.2.5 Estabilidade das amostras formuladas em pó em condições aceleradas ...	156
3.2.6 Estudo da Estabilidade do produto em pó à temperatura ambiente	158
4 CONCLUSÃO	159
REFERÊNCIAS	160
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	191
3.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	192
ANEXO	193

1 INTRODUÇÃO

O ácido fítico é a forma orgânica de fósforo encontrado na forma de seus sais (fitatos), é um composto anti-nutricional considerado principal reservatório natural de fósforo contido em quantidades variáveis em plantas. O fósforo é um mineral essencial, mas, na forma orgânica torna-se um problema na dieta dos animais monogástricos e humanos. O efeito positivo da adição da enzima fitase nas rações de animais monogástricos, ou em ingredientes da dieta alimentar humana, gera a degradação do fator anti-nutricional e consequente melhora na biodisponibilidade de fósforo inorgânico, minerais e alguns nutrientes. Além do aspecto nutricional, a inclusão da fitase proporciona uma maior eficiência no desempenho zootécnico, influenciando diretamente na produção de carne e ovos. Estudos apontam ainda, que a utilização da enzima em rações destinadas à alimentação animal reduz a excreção de fósforo, proporcionando menor poluição em solos e ambientes aquáticos. Deste modo, a enzima fitase ou mio-inositol hexafosfato hidrolase, catalisa a hidrólise gradual do ácido fítico, gerando os produtos de reação o inositol e o fosfato inorgânico.

Ademais, os cultivos submersos com macromicetos são uma alternativa para a obtenção de fitases de interesse econômico e ecológico. Estudos sobre a otimização de bioprocessos de fitase a partir de macromicetos ainda são limitados, pois a maioria dos relatos apresentados na literatura limitam-se a estudos de purificação, identificação e caracterização das enzimas presentes no basidiocarpo dos cogumelos, e não a enzima biossintetizada por processos fermentativos. Porém, há alguns relatos na literatura em fermentação no estado sólido (FES). Luz e colaboradores (2013) estudaram a eliminação do ácido fítico em resíduo da torta de semente de pinhão manso *Jatropha curcas* L com fitase de *Pleurotus ostreatus* em FES alcançando aproximadamente $0,9 \text{ U g}^{-1}$. Salmon e colaboradores (2012) produziram 113 U g^{-1} de fitase de *S. commune* por FES com substrato farelo de trigo. Spier e colaboradores (2012) produziram fitase de *G. stipitatum* e *T. versicolor*, 199 U g^{-1} e 200 U g^{-1} , respectivamente. Neves e colaboradores (2012) utilizaram a extração líquido-líquido para a recuperação da fitase de *Absidia blakesleeana* URM5604 produzida por FES. Entretanto, ainda não há pesquisas sobre síntese de

fitases de macromicetos por cultivo submerso.

No que diz respeito à viabilidade econômica da produção, verifica-se que, de um lado, o mercado de fitases movimentava vultuosos valores: em 2013, este girou em torno de 750 milhões de dólares, com crescimento em torno de 5 a 7% ao ano. Destacando-se, ainda, há a possibilidade de uso de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato em processos fermentativos, o que reduz ainda mais os custos em escala industrial, além de contribuir para uma gestão sustentável desses resíduos.

Partindo dos resultados da presente pesquisa, uma alternativa para o desenvolvimento de formulações comerciais de fitase pode ser explorada com estudos complementares, que aprofundem sobre a adição de aditivos que promovam a manutenção da atividade enzimática durante seu armazenamento até sua aplicação final.

Com o escopo de contribuir com essa busca, a presente tese tem como alvo a produção de enzima fitase por cultivo submerso até seu produto final, visto que seu emprego comercial vem se mostrando vantajoso em vários aspectos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar a produção da fitase termoestável de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso utilizando o extrato aquoso de farelo de trigo como substrato.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar o fungo previamente selecionado por técnicas macroscópicas, microscópicas e moleculares;
- Selecionar fontes de carbono, nitrogênio e minerais para produção de fitase;
- Otimizar as suplementações do meio e as condições físico-químicas do bioprocessamento para a produção da enzima fitase;

- Produzir fitases em frascos de Erlenmeyer com agitação orbital e aeração por difusão, frascos tipo Dreschel com aeração forçada e biorreator do tipo tanque agitado (STR);
- Concentrar a fitase produzida por processos de precipitação com sal e solvente, e por ultrafiltração;
- Caracterizar a fitase através de estudos de: efeito da concentração de substrato, constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$, temperatura ótima, pH ótimo, íons ativadores e inibidores, inativação térmica, concentração de fosfato, determinação da constante K e meia vida da enzima;
- Desenvolver formulações líquida e em pó da fitase produzida com adição de aditivos;
- Estudar a estabilidade em condições aceleradas da enzima líquida e em pó;
- Estudar a estabilidade da fitase formulada em pó durante o armazenamento à temperatura ambiente.

1.1.3 Divisão dos capítulos

A estrutura da presente tese está dividida em seis capítulos:

- Capítulo I: Revisão de literatura;
- Capítulo II: Identificação morfológica e molecular de *Ganoderma* sp. MR-56 produtor de fitase;
- Capítulo III: Estudos de suplementação do meio e otimização do bioprocesso para a produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso;
- Capítulo IV: Estudos de produção de fitases de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso em condições otimizadas em diferentes modelos de biorreatores;
- Capítulo V: Separação, recuperação e caracterização da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56;
- Capítulo VI: Formulação e estabilidade da fitase na forma líquida e em pó;
- ANEXO: Artigo realizado durante a participação como pesquisadora visitante no projeto BIOASSORT (318931) e financiado pelo *European Commission Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme within the 7th*

European Community Framework Programme: “Improvement of technologies and tools, e.g. biosystems and biocatalysts, for waste conversion to develop an assortment of high added value eco-friendly and cost-effective bio-products”. Italy, Naples within the research group – Industrial, Molecular and Environmental Biotechnology group (BIMA Group) at the Department of Chemical Sciences (DSC), University of Naples “Federico II”, sob a supervisão e orientação da professora Vincenza Faraco. Artigo publicado: Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by Ganoderma applanatum LPB MR-56. Fungal biology, v. 11, p. 655-662, 2014.

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FITATO

O ácido fítico (inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato) e seus sais, fitatos, são importantes compostos presentes em plantas, cereais, leguminosas, sementes oleaginosas e em algumas frutas e vegetais. A principal função do ácido fítico nesses ingredientes é uma fonte de fósforo fítico ou estoque energético (CHERYAN, 1980). A principal fonte de fosfato nestes ingredientes está armazenada na forma orgânica (ácido fítico) em torno de 50 a 80% disponível (SARIYSKA et al., 2005). Entretanto, há variação na quantidade de fósforo fítico presente nos vegetais como demonstrado na TABELA 1.

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO FÍTICO E FÓSFORO DISPONÍVEL (%) DOS VEGETAIS

Ingrediente	P total (%)	P fítico (%)	P disponível (%)
Farelo de arroz	1,61	80	19,9
Farelo de girassol	1,5	77	-
Farelo de soja	0,65	60	32,3
Farelo de trigo	0,99	71	33,3
Milho	0,24	72	33,3
Sorgo	0,26	66	34,6

FONTE: Rostagno et al. (2005) e Schramm (2014) modificado.

O ácido fítico é um anel aromático de mio-inositol com seis carbonos e ligados a seis grupos fosfato (PO_4^{-3}). Possui massa molecular de 660 g mol^{-1} e fórmula molecular de $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003).

O fitato pode se ligar a cátions bivalentes como cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês, níquel, cobalto e algumas proteínas formando complexos insolúveis, também denominadas fitinas. A presença desse agente quelante na dieta humana e em animais monogástricos tem um efeito negativo na absorção dos nutrientes. A falta de algum dos minerais essenciais pode resultar em distúrbios metabólicos e comprometer a saúde do organismo (KUMAR et al., 2010; SALMON et al., 2012). Estudos são encontrados na literatura sobre a ação do ácido fítico na redução da digestibilidade de proteínas, aminoácidos (GILANI et al., 2012), amido (THOMPSON e YOON, 1984) e lipídios (NYMAN e BJÖRCK, 1989).

Os animais monogástricos possuem uma pequena quantidade de fitase endógena para hidrolisar efetivamente o fitato. Portanto, a suplementação da dieta com as enzimas fitases exógenas se torna eficaz para hidrolisar os fitatos presentes nos ingredientes das rações fabricadas a partir de cereais e bem como em produtos alimentícios para consumo humano. Além disso, o fitato inibe a ação de algumas enzimas tais como α -amilase, tripsina, lipase e pepsina (HARLAND e MORRIS, 1995; EL-BATAL et al., 2001). Essas enzimas desempenham um papel importante no sistema digestivo e a sua inibição pode causar um comprometimento da digestão e na absorção de nutrientes.

A existência do ácido fítico tem sido conhecida há mais de um século, embora sua função não é completamente compreendida e, conseqüentemente, ainda constitui uma área de pesquisa a explorar (KUMAR et al., 2010).

2.2 FITASES

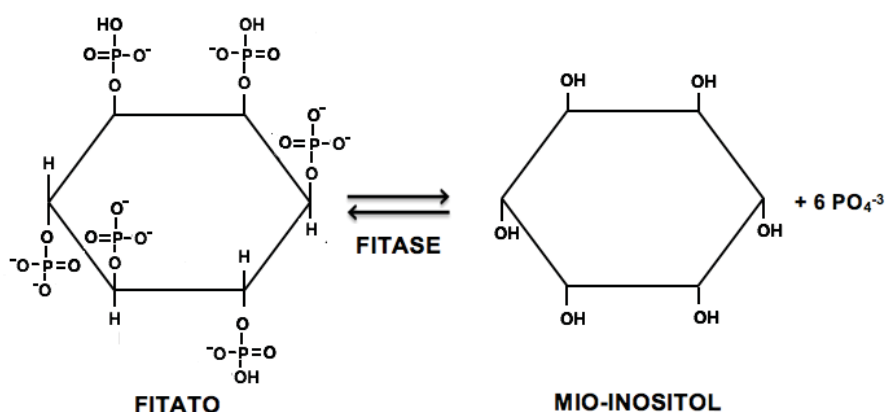
2.2.1 Definição e classificação das fitases

As enzimas fitases ou mio-inositol hexafosfato fosfohidrolases pertencem a classe das hidrolases e ao subgrupo das fosfatases que catalisam a hidrólise do ácido fítico fosfomonoésteres e seus sais em mio-inositol penta, tetra, tris, bis, monofosfatos e fosfato inorgânico (FIGURA 1) (ROOPESH et al., 2006a). De acordo com Greiner e colaboradores (2002) a hidrólise do fitato pela enzima é um processo serial, portanto, cada intermediário fosfatado do mio-inositol (IP *inositol phosphate*) é liberado do sítio ativo da enzima, mas pode ser substrato para a hidrólise seguinte. Teoricamente a hidrólise enzimática completa do fitato gera uma série de fosfatos de mio-inositol menores ($IP_6 \rightarrow IP_5 \rightarrow IP_4 \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_2 \rightarrow IP_1$), por meio de uma série de reações de desfosforilação, para produzir o mio-inositol e seis fosfatos inorgânicos. Entretanto, o mecanismo de catálise e o grau de desfosforilação do ácido fítico são variáveis entre fitases de origem diferentes (GREINER et al., 2002).

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* e a *International Union of Biochemistry* (IUPAC-IUB), as fitases são classificadas em três tipos (3-fitase, 5-fitase e 6-fitase), conforme a posição do primeiro grupamento fosfato a ser removido do anel mio-inositol hexafosfato durante a reação. A 3-fitase (EC 3.1.3.8) ou mio-inositol hexa fosfato-3-fosfohidrolase inicia a hidrólise da ligação éster na posição 3 do carbono do mio-inositol hexafosfato. A 6-fitase (EC 3.1.3.26)

ou mio-inositol hexa fosfato-6-fosfohidrolase remove o grupamento fosfato na sexta posição do mio-inositol hexafosfato. A 5-fitase (EC 3.1.3.72) ou mio-inositol hexafosfato 5-fosfohidrolase identificada por Barrietos e colaboradores (1994), encontrada no pólen de uma flor de lírio, inicia a desfosforilação do fitato na posição 5 do anel de mio-inositol (VATS e BANERJEE, 2004; SCHOMBURG et al., 2009). De acordo com Singh e colaboradores (2011) as 3-fitases (EC 3.1.3.8) são de origem microbiana e as 6-fitases (EC 3.1.3.26) são de origem vegetal, porém contém exceções que seriam de alguns basidiomicetos *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp. e *Trametes pubescens* (LASSEN et al., 2001).

FIGURA 1 - MECANISMO DE HIDRÓLISE PELA ENZIMA FITASE



FONTE: A autora (2015).

Nos últimos anos o número de enzimas descritas como fitases tem aumentado. As fitases podem ser classificadas conforme sua estrutura e propriedades catalíticas. As histidinas ácidas são as mais relatadas na literatura. Essas são caracterizadas pelo pH ótimo ácido, presença de uma sequência conservada de aminoácidos no sítio ativo (RHGX³⁶¹RXP) e um dipeptídeo cataliticamente ativo HD (His³⁶¹Asp³⁶²) (VATS e BANERJEE, 2004; LEI e PORRES, 2003; ULLAH et al., 1991). Geralmente, as fitases de histidina ácida enquadram-se no tipo 3-fitases. As fitases β -*propeller* possuem estrutura semelhante a uma hélice, pH ótimo neutro (ou levemente alcalino) e o íon Ca^{2+} é requerido para a atividade enzimática e termoestabilidade (FU et al., 2008). Usualmente são as 6-fitases. Além disso, Greiner e Konietzny (2006), Cheng e Lim (2006) e Lim e colaboradores (2007) reportaram que as fitases β -*propeller* estão difundidas em ambientes

aquáticos como, por exemplo, a sintetizada pela bactéria aquática *Shewanella oneidensis* (CHENG e LIM, 2006).

As fosfatases ácidas roxas (*purple acid phytases*) são consideradas enzimas não-específicas e apresentam um sítio binuclear contendo ferro em dois estados de oxidação: a forma oxidada de cor púrpura e a forma reduzida de cor rosa (BOZZO et al., 2002). As fosfatases ácidas roxas são principalmente de origem vegetal (GREINER e KONIETZNY, 2010), mas também podem ser encontradas em tecidos animais, fungos e bactérias (GREINER e KONIETZNY 2006; SCHENK et al., 2000).

2.2.2 Fontes de fitases

As fitases têm sido isoladas de fontes microbianas (fungos e bactérias), plantas e alguns tecidos animais, sendo as fontes microbianas utilizadas comercialmente. Dentre elas, as fúngicas são as mais promissoras, pois apresentam a produção extracelular da enzima e estabilidade em pH ácido (TAHIR et al., 2010). Volfová e colaboradores (1994) selecionaram 132 micro-organismos com potencial para síntese de fitase e verificaram que todos que apresentaram capacidade de síntese de fitase eram de origem fúngica. Os principais gêneros fúngicos citados na literatura são *Aspergillus* (SHIVANNA e VENKATESWARAN, 2014; BHAVSAR et al., 2011), sendo algumas comercialmente produzidas; *Penicillium* (AWAD et al., 2014) e *Rhizopus* (SABU et al., 2002). Os basidiomicetos também chamados de fungos superiores têm apresentado características bioquímicas de fitase como, *Schizophyllum* sp. (SALMON et al., 2012), *Agaricus* sp. (COLLOPY e ROYSE, 2004), *Lentinus* sp. (ZHANG et al., 2013a), expressão e clonagem do gene da fitase de *Peniophora* sp., *Trametes* sp., *Cerioporia* sp. e *Agrocype* sp. (LASSEN et al., 2001).

No caso das fitases produzidas por leveduras, alguns exemplos são: a *Saccharomyces cerevisiae* (ROOPASHRI e VARADARAJ, 2014), *Pichia* (VOHRA et al., 2011), *Arxula adenivorans* (BÜTTNER et al., 1991), *Schizosaccharomyces pombe* (DIBENEDETTO, 1972) a qual é uma fitase comercial *Phyzyme* fabricada pela Danisco *Animal Nutrition*, têm sido citadas como potenciais para síntese de fitases. As fitases bacterianas também têm sido estudadas. Como por exemplo, do gênero *Klebsiella* sp. (ESCOBIN-MOPERA et al., 2012), *Bacillus* sp. (SHAMNA et al., 2012), *Pseudomonas* sp. (HOSSEINKHANI et al., 2009), a comercial é a fitase

de *Citrobacter braakii* da empresa DSM *Nutritional Products* (KIM et al., 2003). Porém, a maioria são capazes de produzir fitases intracelulares, como no caso da *E. coli* nos estudos de Greiner e colaboradores (1993).

Algumas fitases endógenas de origem vegetal podem estar presentes no milho, arroz, soja, canola, batata (KUMAR et al., 2010), também encontradas nas folhas de tabaco da espécie *Nicotiana tabacum* (LUNG et al, 2008) e nas folhas de mostarda *Arabidopsis* sp. (RICHARDSON et al., 2001). Alguns autores observaram que a indução da produção da fitase durante a germinação promove o crescimento das sementes e, conseqüentemente, a liberação do fósforo inorgânico (AGOSTINI et al., 2010; YAMAGATA et al., 1979). Concomitantemente, nas plantas, além de liberar o fósforo inorgânico há também a liberação de mio-inositol, um importante indutor de crescimento e fonte de energia (GIBSON e ULLAH, 1990). Ainda Garchow e colaboradores (2006) purificaram uma fitase alcalina do pólen de *Lilium longiflorum*.

Informações sobre fitases em tecidos animais foram constatados. McCollum e Hart (1908) detectaram fitase em fígado de bezerro. Iqbal e colaboradores (1994) relataram baixa atividade de fitase no intestino delgado humano. A enzima degradadora de fitato também pode ser detectada na mucosa do intestino delgado de ratos, coelho e galinhas (BITAR e REINHOLD, 1971; COOPER e GOWING, 1983; IQBAL et al., 1994). Por outro lado, a fitase presente nos tecidos animais, como no intestino, são fosfatases alcalinas não específicas (DAVIES e MOTZOK, 1972; DAVIES e FLETT, 1978). Portanto, é sugestivo que as fitases tenham propriedades catalíticas diferentes das fosfatases alcalinas não são específicas. (BITAR e REINHOLD, 1971). Assim, estas proteínas não tem a função de hidrolisar o fitato em animais monogástricos (KONIETZNY e GREINER, 2002; IQBAL et al., 1994).

2.2.3 Produção de fitases

As fitases microbianas têm sido produzidas por FSm, FES e por tecnologia do DNA recombinante, o gene da fitase pode ser expresso em outro micro-organismo receptor para então ser produzida industrialmente via processo fermentativo. A FSm tem sido o processo mais empregado para produção industrial de fitases. A FSm é considerada de fácil operação, como controle dos parâmetros

fermentativos de temperatura, pH, agitação, consumo de oxigênio e vantajosa para o escalonamento em larga escala industrial quando comparada ao processo fermentativo em estado sólido (DEVI e PRASAD, 2001). Como exemplo, os produtos comerciais (fitases) produzidas por FSm são a Natuphos® (BASF), Quantum® (AB Vista), Ronozyme® (Novozymes) e Finase® (AB Vista). A TABELA 2 contém exemplos de fitases fúngicas produzidas por FSm referidas na literatura.

A linhagem microbiana e as condições físico-químicas de cultivo incluindo a natureza do substrato são alguns fatores importantes que podem afetar o rendimento do processo de produção da enzima (BHAVSAR e KHIRE, 2014). As fitases produzidas por FES apresentam algumas restrições para ampliação em escala industrial, devido à dificuldade de controle e monitoramento de algumas variáveis durante o processo, além de requerer etapa adicional na estratégia de *downstream* como, por exemplo, a extração sólido-líquido. Porém, a produção de fitases por FES pode ser considerada atraente sob o ponto de vista econômico e por apresentar maiores rendimentos que a FSm, como relatam os trabalhos de Spier e colaboradores (2011a) e Shivanna e Venkateswaran (2014). Em ambos os casos, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato, a obtenção das enzimas por FES apresentou significativa a produção de fitase e redução dos custos, devido, principalmente, ao baixo valor econômico do substrato utilizado.

Outra estratégia para o aumento da produção e melhoramento das características bioquímicas das fitases é a aplicação de tecnologias da engenharia genética. Estudos relatam que a clonagem e expressão de genes de fitase em outros organismos adequados são úteis para alcançar atividades mais elevadas. Como no caso da fitase derivada de *Peniophora lycii* expressa em *Aspergillus oryzae*, que é originária do produto Ronozyme® da empresa Novozymes e parceira da empresa DSM (LASSEN et al., 2001). Outra preparação comercial é a fitase de *Citrobacter braakii* expressa em *Aspergillus oryzae* da empresa DSM *Nutritional Products, Inc* (DSM, 2014). O método de mutagênese e fusão de protoplastos também podem ser aplicados como ferramentas na produção da enzima (GUNASHREE e VENKATESHWARAN 2009; MURLIDHAR e PANDA 2000). Gorcom e colaboradores (2006) depositaram uma patente sobre clonagem e expressão de fitases microbianas utilizando as técnicas transformação de protoplastos e eletroporação. Porém, o custo-benefício dessas tecnologias ainda é

um importante fator limitante (BHAVSAR e KHIRE, 2014), além de requerer maior tempo para todo o processo.

TABELA 2 - PRODUTIVIDADE DE FITASES FÚNGICAS DE FSm REPORTADAS NA LITERATURA

Micro-organismo	Produtividade (U mL ⁻¹ h ⁻¹)	Meio fermentativo/ substrato	Referência
<i>Aspergillus ficcum</i> (NRRL 3135)	0,019	Glicose 80, KCl 0,5, MgSO ₄ 5, Fe ₂ (SO ₄) 0,1, MnSO ₄ 0,02, NaNO ₃ 8,6, (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 e fitato de sódio 10 (g L ⁻¹)	Coban e Demirci (2014a)
<i>Aspergillus niger</i> CFR 335	0,08	Caldo de batata dextrose	Shivanna e Venkateswaran (2014)
<i>Rhizopus oligosporus</i> 556	0,20	Farelo de trigo 1%	Haritha e Sambasivarao (2009)
<i>Aspergillus niger</i> St-6	1,7	Glicose 5, peptona 18, KCl 0,5, MgSO ₄ 1,5, KH ₂ PO ₄ 1, CaCl ₂ e farelo de trigo 20 (g L ⁻¹)	Tahir et al., 2010

FONTE: A autora (2015).

2.2.4 Mercado mundial das fitases

Ao longo dos últimos 25 anos, o mercado mundial de fitases experimenta uma exponencial ascensão, destacando-se entre as enzimas destinadas à aplicação em ração animal.

Pesquisas apontam que, na década de 90, aproximadamente 50 milhões de dólares foram movimentados com a venda de fitases comerciais, o que representava, à época, cerca de um terço do mercado das enzimas (SHEPPY, 2001). Em meados de 2005, o volume triplicou: chegou a movimentar em torno de 187 milhões de dólares (HAEFNER et al., 2005). Em 2010, assentou-se que o crescimento das vendas de fitase e atingiu o patamar de 10% ao ano (COWIESON et al., 2008).

Atualmente, cerca de 60% das vendas totais das enzimas com aplicação em alimentação animal são de fitases (ADEOLA e COWIESON, 2011; LEI et al., 2013), o que corresponde a um mercado global das enzimas que movimenta aproximadamente 350 milhões de dólares por ano. Ainda, a fitase encontra-se presente em cerca de 70% das rações destinadas à dieta de suínos e aves, setor que deve atingir a aplicação de 100% em alguns anos (LEI et al., 2013).

O valor comercial do produto também sofreu, nos últimos anos, destacada redução, mostrando-se economicamente atraente. Em 2010, o produto era colocado

no mercado a uma média de 0,75 centavos de dólares por tonelada de ração (que contém 500 U de fitase) (COWIESON et al., 2008), hodiernamente o custo mostra-se inferior a 0,6 centavos de dólares.

Ademais, a inclusão da fitase como aditivo em dietas de animais monogástricos tem apresentado benefícios diretos para a produção, bem como a redução do fósforo em suas excreções, e para o meio ambiente com a redução do efeito anti-nutricional, o fitato, que chega a custar para produtores de animais em torno de 2,16 bilhões dólares por ano (WORLD POULTRY, 2014). Assim, estima-se que a economia com as adições dessa enzima na ração aproxima-se a 2 bilhões de dólares anualmente (COWIESON et al., 2008; SANTOS e SHEENAN, 2010).

Em 2010, o mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões e pressupõe-se chegar a 4,4 bilhões dólares em 2015 (BINOD et al., 2013).

2.2.5 Fitases comerciais

As fitases comerciais são preparações enzimáticas de origem microbiana, produzidas por técnicas de fermentação (HAEFNER et al., 2005) e podem estar disponíveis na forma de pó, granulada ou líquida. A primeira fitase comercial foi lançada no mercado em 1991 (GREINER e KONIETZNY, 2006) a Natuphos® da BASF, que é uma recombinante de *A. niger* NRRL 3135 em *A. niger* CBS, a qual aumentou 50 vezes a produção de fitase quando comparada com a linhagem selvagem (CASEY e WALSH, 2004; HAEFNER et al., 2005). Além dessa, outras preparações de fitases estão disponíveis no mercado (TABELA 3). O valor de qualquer produto de fitase é dependente da sua eficácia e estabilidade (SULABO et al., 2011). As preparações enzimáticas precisam apresentar características essenciais como: resistência à temperatura de peletização da ração, em torno de 70-90°C, estabilidade em pH extremos, durante armazenamento e até a aplicação final (USHASREE et al., 2011; BHAVSAR e KHIRE, 2014). Na TABELA 3 são apresentados os principais produtos comerciais disponíveis no mercado contendo fitases.

TABELA 3 - PRINCIPAIS FITASES COMERCIAIS DISPONÍVEIS NO MERCADO

Produto	Empresa	Micro-organismo originário	Micro-organismo hospedeiro	Fermentação	Atividade de fitase (U/g)	Dosagem em ração	Refs.
Natuphos®	BASF	<i>A. niger</i> var. <i>ficuum</i>	<i>A. niger</i>	Líquida	10000	500 U/kg, 53-64 g/ton	Basf, 2014
Allzyme®	Alltech	<i>A. niger</i>	-	Sólida	-	200 g/ton	Alltech, 2014
Phyzyme® XP	Danisco	<i>E. coli</i>	<i>S. pombe</i>	-	10000 5000	500 U/kg	Danisco, 2014
Axtra® PHY	Danisco	<i>Buttiauxella</i>	<i>T. reesei</i>	-		250-2000 FTU/kg	Danisco, 2014
Ronozyme® ; Bio-Feed Phytase	DSM; Novozymes	<i>P. lycii</i>	<i>A. oryzae</i>	Líquida	2500 5000	450-750 U/kg, 180-300 g/ton	DSM, 2014
Finase®	AB Enzymes	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	-	5000	500 U/kg, 100 g/ton	AB enzymes, 2014
Quantum®	AB Vista	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	-	2500 5000	100 U/kg	AB Vista, 2014

FONTE: A autora (2015).

2.3 CONDIÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS PARA A PRODUÇÃO DE FITASE

Para o cultivo de micro-organismos são essenciais as condições adequadas para o seu desenvolvimento, bem como para a síntese da biomolécula de interesse. Dentre essas condições, incluem fontes de energia (macro e micronutrientes), fatores de crescimento ou indutores, vitaminas, minerais, pH, temperatura de crescimento adequada além da presença ou não de oxigênio, um inóculo viável, entre outras.

Konazani e Satyanarayana (2012) salientaram a importância da agitação, aeração, pH, composição do meio de cultivo, viscosidade, tamanho, idade e morfologia do inóculo que influenciam a produtividade da fitase por FSm. Vohra e Satyanarayana (2003) também enfatizaram que os parâmetros físicos e químicos como o pH, temperatura, agitação do meio fermentativo e o oxigênio consumido e os nutrientes para o meio fermentativo, são fatores importantes para o crescimento do micro-organismo e para a produção de fitase. Do mesmo modo, Roy e colaboradores (2013) ressaltaram que para a obtenção de fitases em processos fermentativos é necessário estabelecer fatores físicos e químicos e condições nutricionais favoráveis para o crescimento do micro-organismo. As condições ou exigências de cultivo citadas podem ser otimizadas para obtenção máxima do produto desejado e também viabilizando uma abordagem mais eficiente em termos

custos do processo. Contudo, a produção de fitase é altamente influenciada pelos componentes do meio, em particular a qualidade das fontes de carbono, nitrogênio, minerais e notadamente o fósforo.

2.3.1 Fontes de carbono

O ácido fítico ou seus sais são amplamente utilizados como indutores para síntese de fitase microbiana bem como fonte de carbono.

Sasirekha e colaboradores (2012) otimizaram os componentes do meio de cultivo em FSm com auxílio de ferramentas estatísticas para a indução da produção da fitase de *Pseudomonas aeruginosa* e observaram que o fitato de sódio teve efeito positivo na produção. Mohamad e colaboradores (2012) realizaram um estudo de seleção de bactérias termófilas produtoras de fitase utilizando meios de cultivo sólido contendo fitato de cálcio como indutor enzimático. As bactérias encontradas como positivas para a síntese de fitase são pertencentes ao gênero *Geobacillus* sp., *Anoxybacillus* sp. e *Anoxybacillus rupiensis* UniSZA-7.

Salmon e colaboradores (2012) utilizaram resíduos e subprodutos agroindustriais como fontes alternativas de ácido fítico assim como a casca de café, farelo de soja, farelo de trigo, arroz, milho, cevada, centeio e polpa cítrica para produção de fitase de *S. commune*. Dentre os subprodutos, o farelo de trigo foi o melhor substrato para FES, bem como para maior produção da enzima, embora os outros resíduos também apresentaram efeito positivo na indução de fitase.

Dentre as fontes de carbono mais usadas para a indução da síntese de fitase microbiana tem-se a glicose, monossacarídeo diretamente metabolizável. Por essa razão, muitos estudos reportam os efeitos da presença de glicose no meio de cultivo sobre a produção de fitase por fungos filamentosos em FSm (SHIEH e WARE, 1968; Bhavsar et al., 2008; GIBSON, 1987). Shieh e Ware (1968) avaliaram o aumento na síntese da fitase de *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 em um meio de cultivo contendo amido de milho e baixa concentração de fósforo inorgânico. Como o amido é um polissacarídeo, esse não é diretamente fermentescível, então a linhagem microbiana deveria ter capacidade de hidrolizá-lo para utilizar suas unidades monossacarídicas como fonte de carbono para seu crescimento e síntese de metabólitos (SHIEH e WARE, 1968).

O farelo de trigo é um subproduto agroindustrial que tem sido amplamente utilizado como uma fonte alternativa de carbono, mas também contém proteínas, minerais e um alto teor de ácido fitico. Diversos relatos foram encontrados na literatura, Roopesh e colaboradores (2006b) sintetizaram fitase de *Mucor racemosus* NRRL 1994 com farelo de trigo como substrato por FES. Kumar e colaboradores (2012b) otimizaram o meio de FSm usando 10% m/v de farelo de trigo para aumentar a produção de fitase de *Achromobacter* sp. PB-01.

2.3.2 Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio têm função na síntese proteica e outros mecanismos bioquímicos celulares. A quantidade de fonte de nitrogênio em um cultivo interfere na produção da proteína de interesse, bem como a relação C/N (carbono/nitrogênio). Além de fontes inorgânicas, as fontes orgânicas complexas de nitrogênio pode ser outra opção. Algumas fontes alternativas de nitrogênio têm sido estudadas para a redução de custos durante o processo fermentativo (NEVES, 2003), tais como melaço de cana e soja, xarope de milho, soro de leite e farinha de soja como matérias-primas industriais ricas em nitrogênio (PAPAGIANNI, 2004). Vassilev e colaboradores (2007) otimizaram o meio de FES para a produção de fitase de *A. niger* e verificaram que a milhocina (resíduo líquido do processamento do milho) como fonte de nitrogênio aumentou significativamente a produção enzimática. Lata e colaboradores (2013) conseguiram um aumento na síntese de fitase de *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685 quando suplementaram o meio de cultivo com fonte de nitrogênio (0,3% m/v), sendo que a melhor foi extrato de levedura, seguida de caseína e nitrato de amônio. Singh e colaboradores (2013) otimizaram meio de cultivo para avaliar diferentes fontes de nitrogênio (0,5% m/v de extrato de levedura, nitrato de sódio, sulfato de amônio, ureia e acetato de amônio) na produção de fitase de *Bacillus subtilis*, sendo a melhor fonte o extrato de levedura (produção de 398 U mL⁻¹).

2.3.3 Fontes de fósforo

O fósforo (P) é um elemento não-metálico e encontrado na natureza na forma de derivados de fosfatos. Além disso, é um macronutriente essencial para os

sistemas biológicos e apresenta variadas funções. O fósforo compõe o DNA, RNA, membranas celulares fosfolipídicas, além de ser um elemento estrutural dos tecidos esqueléticos em animais e seres humanos. Está associado à produção, transporte e armazenamento de energia em forma de ATP (adenosina trifosfato), bem como participa das rotas metabólicas celulares e do equilíbrio ácido-básico do plasma sanguíneo (MCDOWELL, 2003).

A ocorrência do fósforo em meios fermentativos pode atuar como um regulador da produção de fitase, como relatado por diversos pesquisadores (HOWSON e DAVIS, 1983; GIBSON, 1987; ULLAH et al, 1987; CHELIUS e WODZINSKI, 1994; GARGOVA et al., 1997; VUOLANTO et al, 2001) e não somente por fungos, mas também em outros gêneros microbianos.

As fontes de fósforo mais comumente utilizadas para a produção de fitases são fitato de sódio, fitato de cálcio, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003). Não obstante, a maioria dos substratos utilizados para FSm e FES contém fósforo inorgânico disponível na sua composição, como por exemplo o farelo de trigo contendo ácido fítico.

Shieh e Ware (1968) analisaram que baixas concentrações de fósforo inorgânico (KH_2PO_4) induziram a produção de fitase de *A. ficuum* NRRL 3135 porém, o crescimento da biomassa foi limitado. Por outro lado, o aumento na concentração de fosfato inorgânico no meio de cultivo promoveu o crescimento do micro-organismo, embora a síntese de fitase diminuiu significativamente. Porém, as investigações conduzidas por Kim e colaboradores (1999a) e Vats e Banerjee (2002) verificaram que a biomassa e a concentração de proteínas não foram afetadas pela concentração de fosfato inorgânico no meio.

Bhavsar e colaboradores (2008) concluíram também que a síntese de fitase de *A. niger* NCIM 563 foi afetada pelo fosfato inorgânico de resíduos agrícolas em FSm, o qual variou 2,8-8 mg g^{-1} . Em contraste, os resíduos agrícolas que continham menos do que 4 mg g^{-1} de fosfato inorgânico mantiveram a produção de fitase.

O ácido fítico é considerado uma fonte orgânica de fósforo e está presente em uma grande porção no grãos de trigo, trazendo importância durante a germinação (WILLIAMS, 1970). Spier e colaboradores (2008) estudaram diferentes substratos com fonte orgânica (fósforo fítico) como potenciais indutores de síntese microbiana de *A. niger* FS3 por FES. Os autores usaram polpa cítrica, farelo de

trigo, polpa de maçã, farelo de soja, farelo de arroz e demais combinações entre eles. A polpa cítrica foi ao melhor substrato para produção de fitase ($51,5 \text{ U g}^{-1}$).

2.3.4 Agitação e aeração em FSm

A agitação e a aeração em FSm são essenciais para o crescimento dos micro-organismos que necessitam de oxigênio (aeróbios) visando a produção de fitases. Os principais objetivos da agitação são a dispersão de bolhas de ar, com consequente suprimento de oxigênio às células microbianas, a suspensão das células e a transferência de calor e massa no meio (NEVES, 2003). O oxigênio também participa da geração de energia através do metabolismo de respiração mitocondrial celular e é fundamental para obter uma velocidade de crescimento específico significativa (NEVES, 2003; SILVA et al., 2001). À vista disso, Kleist e colaboradores (2003) e Othman e colaboradores (2014) afirmaram que para uma elevada produção de fitase é necessário uma demanda elevada de oxigênio, os quais geralmente são controlados por agitação ou taxa de aeração em FSm. A síntese de fitase por *Escherichia coli* BL21 recombinante foi influenciada com taxa de aeração 3 vvm para alcançar rendimentos elevados de produção da enzima (OTHMAN et al., 2014). Papagianni e colaboradores (2001) compararam duas velocidades de agitação tipo orbital por FSm em frascos de Erlenmeyer. Observou-se que a atividade de fitase *Aspergillus niger* foi maior com 300 rpm do que em 150 rpm. Kumari e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de diferentes velocidades de agitação na produção da fitase de um fungo denominado PF-3. Dentre as velocidades testadas (100, 130, 160, 220 rpm), a melhor para a síntese da enzima foi 160 rpm.

2.3.5 pH

A produção de fitases é extremamente dependente do fator pH e geralmente a maioria das fitases só são produzidas e ativas em determinadas faixas de pHs (SANDBERG, 1997). Para a síntese de fitases, o parâmetro pH influencia a produtividade durante a FSm (KONAZANI e SATYANARAYANA, 2012). Desta maneira, Hussin e colaboradores (2012) otimizaram o bioprocesso de fitase de *Enterobacter sakazakii* ASUIA279 por FSm em frascos de Erlenmeyer e demonstraram que o pH 7,1 foi significativo na produção da enzima. Do mesmo modo, a fitase de *Aspergillus flavus* foi otimizada por FES utilizando farelo de trigo

como substrato com pH 6,0 (GULL et al., 2013). Nascimento e colaboradores (2013) relataram que a síntese da fitase de *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi influenciada pelo pH 4,0 e temperatura 30°C durante a FSm. Outras descrições encontradas na literatura como, pH 5,0 de *Pseudomonas* sp. (SELVAMOHAN et al., 2012), pH 6,5 de *Bacillus subtilis* (SHAMNA et al., 2012), pH 5,5 de *Klebsiella* sp. DB-3 FJ711774.1 (MITTAL et al., 2012).

2.3.6 Temperatura

A temperatura ótima para produção de fitases oriundas de micro-organismos varia entre 27 a 37°C em processos fermentativos (KONAZANI e SATYANARAYANA, 2012). A temperatura ótima pode variar dependendo da fonte de microbiana (bactéria, fungo ou levedura), vegetal ou animal. A temperatura é um importante parâmetro no crescimento dos micro-organismos, na produção e na estabilidade da enzima (SHIVANNA e VENKATESWARAN, 2014). Geralmente a maioria das fontes microbianas são mesófilas porém, com algumas exceções como fungos termófilos *S. Thermophile* possui temperatura de fermentação de 45°C (SINGH e SATYANARAYANA, 2012) e *Rhizomucor pusillus* de 50°C (CHADHA et al., 2004).

Shivanna e Venkateswaran (2014) produziram fitases de *A. niger* CFR 335 e *A. ficuum* SGA 01 por FSm e FES e ambas com temperatura de fermentação de 30°C. Sarlin e Philip (2013) reportaram a síntese de fitase da levedura *Fenneropenaeus indicus* utilizando a temperatura de 28°C. Porém, Lan e colaboradores (2002) aplicaram uma temperatura de fermentação superior a 39°C para a produção de fitase da bactéria *Mitsuokella jalaludinii*.

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR MACROMICETOS

O cultivo submerso conduzido por fungos da classe Basidiomycota (macromicetos) tem recebido atenção como alternativa promissora e reprodutível para a produção eficiente de biomassa e de metabólitos. Os macromicetos têm sido estudados e aplicados com uma multiplicidade em diversas áreas pelo seus valores nutricionais, terapêuticos, cosméticos e na biorremediação. Outra notoriedade é que os fungos superiores são produtores expressivos de enzimas. Na literatura tem sido reportados estudos sobre a síntese de celulasas e xilanases de *Ganoderma*

applanatum (SALMON et al., 2014a), proteases de *Pholiota nameko* (GUAN et al., 2011), lacases de *Pleurotus ostreatus* (KARP et al., 2012), amilases de *Tricholoma matsutake* (HUR et al, 2001), pectinases de *Polyporus squamosus* (PERIČIN et al., 2001), catalases de *Antrodia camphorata* (KEN et al, 2008), manganês peroxidase de *Stereum ostrea* (PRAVEEN et al., 2012), fitases de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., *Trametes pubescens* (LASSEN et al., 2001) entre outras enzimas.

2.5 *Ganoderma* sp.

O gênero *Ganoderma* sp. pertence a família Ganodermataceae, da ordem Polyporales e à classe dos Basidiomicetos (FIGURA 2). Todas as espécies são fungos de podridão branca, algumas são saprófitas enquanto outras são parasitas de raízes de árvores. A FIGURA 3 apresenta algumas espécies do gênero *Ganoderma* e suas estruturas macroscópicas e microscópicas. Algumas espécies do gênero *Ganoderma* possuem importância terapêutica, ecológica e cosmeceutica. Na medicina tradicional chinesa, acreditam que o consumo regular deste cogumelo proporciona vitalidade e longevidade para os indivíduos (PATERSON, 2006; SILVA, 2006; STANLEY et al., 2005).

Cannon e Kirk (2007) descreveram as características morfológicas e microscópicas da família Ganodermataceae, e o principal gênero é o *Ganoderma*. As características relatadas são: basidioma pileado e crescimento perene. Algumas espécies não possuem pecíolo (haste de sustentação), têm colorações que variam do marrom à avermelhado, aspecto lenhoso, superfície do píleo lisa ou rugosa e, frequentemente brilhante. O sistema hifal é di ou trimítico, hifas hialinas e conexões com hifas esqueléticas abundantes. O micélio tem geralmente coloração pálida, poroso, espesso e seccionado. Os basidiósporos têm coloração marrom, formas ovóide a elípticas e podem ter diversos tamanhos, paredes espessas, e camada interna fortemente pigmentada e ornamentada.

Conforme relatos de Paterson (2006), o *Ganoderma* sp. produz compostos bioativos que possuem uma ampla gama de atividades terapêuticas. Os efeitos benéficos nos tratamentos reportados na literatura são: hipertensão, artrite, bronquite, asma, anorexia, gastrite, diabetes, hipercolesterolemia, nefrite,

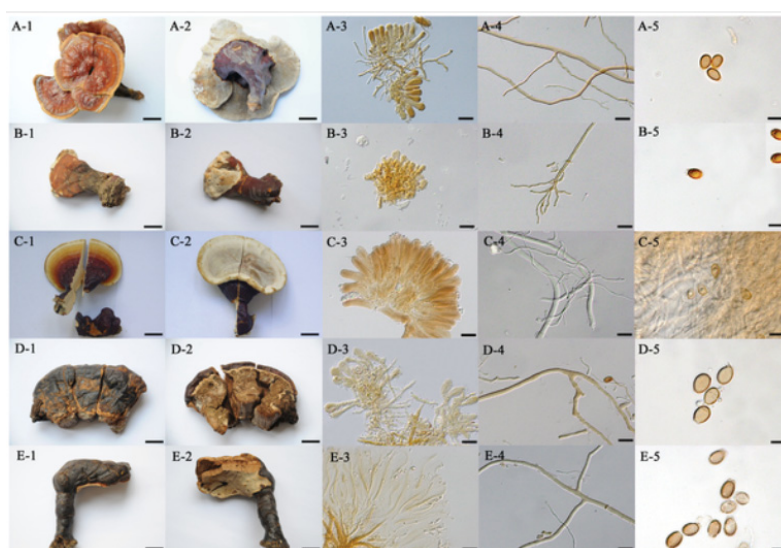
dismenorreia, nefrite, constipação, hemorroida, lúpus eritematoso, hepatite e problemas cardiovasculares. Do mesmo modo, efeitos anti-tumorais, antimicrobianos e anti-HIV (GAO et al., 2003; KIM et al., 1993; PATERSON, 2006) têm sido relatados. Jong e Birmingham (1992) reportaram que polissacarídeos de *Ganoderma* sp. inibiram o desenvolvimento de tumores. Esse fungo é igualmente citado por possuir substâncias com ação antioxidante, bem como aplicações em cosméticos (CHEN et al, 2008; SU et al., 1997). Contudo, várias espécies do gênero *Ganoderma* sp. têm sido estudadas como fontes de compostos terpênicos. Grande parte desses compostos apresenta atividade antiinflamatória, expectorante (DUKE, 1985) e antimicrobiana (RAMAN et al., 1995), além do uso na produção de fragrâncias (PETERSEN, 2006). Esse fungo também tem sido utilizado na biorremediação, com o objetivo de degradar os contaminantes (compostos orgânicos) nos solos (RIGAS et al., 2007).

Pesquisas sobre a obtenção, isolamento e a purificação dos compostos bioativos têm sido realizadas para garantir a qualidade e eficácia dos mesmos. A empresa *The fungi Perfecti* (USA) tem diversos produtos de cogumelos disponíveis mercado, dentre eles destaca-se o extrato em pó de *Ganoderma lucidum* em cápsulas chamado *Host Defense® Reishi Extract--1 Fluid oz* que declara revigorar a saúde (FUNGI PERFECTI, 2014).

FIGURA 2 – BASIDIOMA DE *Ganoderma* sp.



FONTE: <http://www.gopixpic.com/ganoderma>

FIGURA 3 - ESPÉCIES DE *Ganoderma* sp.

FONTE: WANG et al., (2012).

LEGENDA: A-1: *Ganoderma multipileum*, basidioma; A-2. lamelas; A-3. micélios; A-4. hifas; A-5. basidiosporos. B-1: *Ganoderma tropicum*, basidioma; B-2. lamelas; B-3. micélios; B-4. hifas; B-5. basidiosporos. C-1: *Ganoderma weberianum*, basidioma; C-2. lamelas; C-3. micélios; C-4. hifas; C-5. basidiosporos. D-1: *Ganoderma resinaceum*, basidioma; D-2. lamelas; D-3. micélios; D-4. hifas; D-5. basidiosporos. E-1: *Ganoderma lucidum*, basidioma; E-2. lamelas; E-3. micélios; E-4. hifas; E-5. basidiosporos.

2.6 APLICAÇÕES DAS FITASES

As fitases são consideradas enzimas versáteis devido à variedade de aplicações biotecnológicas. Suas aplicações são em meio ambiente, cosméticos, agricultura, produtos de consumo humano e principalmente como aditivo na alimentação animal.

2.6.1 Indústria de ração animal

Com os avanços na biotecnologia a nutrição animal vem se beneficiando com o uso das enzimas industriais, atuando no melhoramento da digestibilidade de nutrientes. O uso das enzimas em ração apresenta variadas vantagens como, produtos de melhor qualidade, redução de perdas nutricionais além da redução da adição de fontes de matérias-primas não renováveis. Além disso, a aplicação das enzimas tem gerado benefício econômico e alternativas ecológicas (USHASREE et al., 2011).

Os animais necessitam de fósforo na dieta para promover uma boa nutrição e desencadear os processos bioquímicos essenciais, bem como o crescimento ósseo. Uma vez que o fósforo fítico nas plantas não está prontamente disponível, a suplementação de fosfato inorgânico na dieta é necessária para atender às exigências desse mineral dos animais monogástricos. Com a aplicação da fitase em rações, especialmente para aves e suínos, é desnecessário a adição do fosfato inorgânico nas dietas dos mesmos (LEI et al., 2013).

Radcliffe e Kornegay (1998) e Esteve-Garcia e colaboradores (2005) estimaram entre 300 a 600 unidades de atividade de fitase por quilograma de ração requerido para tornar disponível cerca de 0,8 g de fósforo inorgânico disponível e o qual podem substituir em torno de 1,0-1,3 g por quilograma de fósforo inorgânico. Atualmente, o preço do fosfato dicálcio usado na ração animal gira em torno de 1.200 dólares por tonelada. Comparando com o custo médio da fitase contendo 1.000 unidades por quilograma de ração, equivale a 0,5-2 dólares por tonelada de ração (LEI et al., 2013).

Wodzinski e Ullah (1996) realizaram estudos demonstrando que a inclusão da fitase na dieta de todos os animais monogástricos nos Estados Unidos não só diminuíram o fósforo liberado no meio ambiente totalizando $8,23 \times 10^7$ kg por ano, mas os produtores de animais também economizariam $1,68 \times 10^8$ dólares por ano. Segundo variadas comprovações, a utilização da fitase como aditivo na alimentação animal tornou-se amplamente aceita e várias preparações de fitase comercial têm sido produzidas.

Na literatura existem muitos estudos sobre a inclusão de fitases na dieta dos animais não ruminantes. Desde 1990, o efeito benéfico da fitase na digestibilidade do fósforo fítico foi confirmado e, em seguida, novamente confirmado em frangos de corte (KORNEGAY et al., 1996), em suínos (ADEOLA et al., 2004), perus (RAVINDRAN et al., 1995), galinhas poedeiras (GORDON e ROLAND, 1998) e patos (ORBAN et al., 1999; ADEOLA, 2010). A fitase também tem sido considerada emergente na aplicação em ração de peixes (KUMAR et al., 2012a). Além disso, estudos mais recentes apresentam a suplementação da fitase na dieta de animais domésticos, como os caninos (YEO, 2012). O efeito da fitase na absorção de cálcio, outros sais minerais e aminoácidos também foram reportados em animais (ADEOLA e COWIESON, 2011).

Ushasree e colaboradores (2011) relataram que 60% da produção mundial de rações para suínos e aves contêm fitases e ainda estima-se que o mercado das fitases avance cada vez mais, alcançando a possível suplementação de 100% da enzima em todas as rações.

2.6.2 Indústria de alimentos

As fitases têm se destacado com potencialidade para o uso em processamentos de alimentos para consumo humano. As pesquisas têm se concentrado no melhoramento do valor nutricional dos alimentos de origem vegetal, bem como o aprimoramento de técnicas durante o processamento de alimentos. Porém, produtos contendo enzimas fitases disponíveis no mercado ainda são limitados. No entanto, as fitases podem ser encontradas como suplementos alimentares, como por exemplo o produto *Digest* (Enzymedica Inc., 2014).

A aplicação das enzimas fitases em processos de panificação destinados à diminuição do teor de fitato tem sido reportada na literatura (BOHN et al., 2008; HAROS et al., 2001a,b; SINGH et al., 2011). O benefício da adição da fitase tem como objetivo melhorar a qualidade dos pães das seguintes maneiras: a primeira é no aspecto nutricional, reduzindo o fitato contido nos ingredientes da massa, e a segunda o volume dos pães e a textura da crosta foram melhores nas massas com fitase do que naquelas sem a adição da enzima, devido ao aumento da biodisponibilidade do cálcio, bem como a ativação da alfa amilase endógena (HAROS et al., 2001a,b).

Khare e colaboradores (1994) relataram a aplicação da fitase em leite de soja, o qual possui alto teor de fitato. Após a aplicação da fitase foi obtido um produto sem a presença desse anti-nutriente.

Outras aplicações têm sido exploradas, Fujita e colaboradores (2001) utilizaram uma fitase mutante produzida por *Aspergillus oryzae* (KL-38) durante a fermentação alcoólica da bebida *sake* para maior produção de etanol. Como o meio fermentativo é rico em arroz, o qual apresenta 80% do fósforo orgânico, explica-se a aplicação das fitases para a sua degradação e liberação de fosfato inorgânico, importante para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.6.3 Indústria de cosméticos

Outro novo segmento para a aplicação de fitases são em produtos cosméticos. O suplemento ZYTAZE[®] (OcuSOFT[®], EUA) contendo a enzima fitase e citrato de zinco foi desenvolvido com a finalidade de maximizar a absorção do zinco, prolongando os efeitos estéticos da aplicação da toxina botulínica do Botox[®] (Allergan, Irvine, CA), Myobloc[®] (Solstice Neurosciences, Malvern, PA) e Dysport[®] (Tercica, Brisbane, CA). A toxina botulínica é uma metaloprotease zinco-dependente. Portanto, para que a toxina seja mais efetiva, deve-se ligar ao zinco presente no organismo. Os fitatos impedem a absorção do zinco, pois quelam esse mineral. Desse modo, com o uso desse produto, os fitatos presentes na dieta alimentar são hidrolizados pela enzima fitase, potencializando a ação entre a toxina e o zinco. Um estudo realizado por Koshy e colaboradores (2012) demonstrou que a utilização do ZYTAZE[®], por um período de quatro dias que antecede a aplicação das injeções de Botox[®], resultou em um aumento (30%) tanto no efeito do tratamento, bem como na duração do efeito proporcionado pelo tratamento estético.

2.6.4 Agricultura

No setor agrícola mundial, uma das maiores dificuldades é a deficiência do fósforo no solo. Além disso, o fósforo é considerado o macronutriente mais utilizado em adubos e a quantidade existente no solo é encontrada na forma de fitatos. Existe um grande número de estudos que citam o uso da fitase com a finalidade de melhorar a absorção desse mineral e o crescimento das plantas, bem como a redução da poluição de fósforo no meio ambiente (SINGH et al., 2011).

Estudos sobre a expressão do gene da fitase β -*propeller* de *B. subtilis* em folhas de tabaco mostraram que as atividades de fitases presentes nas folhas e raízes transgênicas foram 7 a 9 vezes maior do que aqueles no tipo selvagem. Em um cultivo líquido contendo fitato de sódio 1 mM como única fonte de fósforo, as linhagens transgênicas de tabaco acumularam 1,7 a 2,2 vezes mais biomassa do que as plantas do tipo selvagem ao longo dos 30 dias de crescimento (LUNG et al., 2005). Da mesma forma, Yadav e Tarafdar (2003) realizaram experimentos com fitases produzidas por *Aspergillus*, *Emmericella* e *Penicillium*, as quais foram

utilizadas como inoculantes de sementes, com a finalidade de analisar a eficiência da nutrição de fósforo orgânico em plantas.

Assim, como cerca de 30 a 80% do total de fósforo nos solos está na forma de fitato, conseqüentemente o mineral no solo é pouco utilizado pelas plantas. Foi relatado que micro-organismos produtores extracelulares de fitases quando inoculados no solo melhoram a disponibilidade dos ânions polivalentes e íons metálicos e metabólitos microbianos (GEORGE et al., 2006).

2.6.5 Meio ambiente

Nos vegetais a maior parte do fósforo está estocado em fitato. Quando o animal ingere a ração sem a presença da enzima fitase, há excreção do fósforo fítico ao meio ambiente, pois seu organismo é incapaz de assimilá-lo (LUDKE et al., 2002). Os suínos e aves produzem diariamente um volume grande de dejetos, incluindo o fósforo na forma orgânica. O efeito dos dejetos de animais pode prejudicar o solo, poluir o meio ambiente e prejudicar economicamente os agricultores. Como o solo torna-se saturado de fósforo e a capacidade máxima de absorção pelas plantas pode ser ultrapassada, esse mineral pode alcançar o lençol freático (RODRIGUES et al., 2007). As conseqüências da poluição nos recursos de água por dejetos dos animais com alta concentração de fósforo pode desencadear o fenômeno chamado de eutrofização, causado pelo crescimento desordenado de plantas aquáticas nos mananciais. O impacto pode atingir todo um ecossistema do fundo dos rios, lagos e lagoas (BEZERRA, 2005). O impacto ambiental causado pelo fósforo excretado pelos animais pode ser reduzido em torno de 30% com o uso de dietas suplementadas com a enzima fitase (SIMONS e VERSTEEGH, 1990).

2.7 RECUPERAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASE

A purificação de enzimas, bem como de outras biomoléculas, podem ser realizadas por variados métodos que são adaptados dependendo das características bioquímicas, do grau de separação e purificação desejados. O procedimento de purificação de enzimas pode ser dividido em quatro etapas principais: separação de células do meio de cultivo (clarificação); purificação de baixa resolução (precipitação com adição de sais ou solventes orgânicos);

purificação de alta resolução (cromatografias) e, finalmente, o tratamento final do produto (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

Muitos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de purificar a fitase, sendo esta destinada a diversas finalidades como estudos de caracterização bioquímica, estudo da estrutura molecular (cristalografia), uso na ração animal e em produtos para consumo humano. O conhecimento sobre a caracterização bioquímica da enzima estudada relacionado à estabilidade, temperatura, pH, moléculas ativadores e/ou inibidores é necessário para a obtenção de uma boa purificação (BEYNON, 1996).

A literatura traz metodologias diferentes para atingir este objetivo, utilizando técnicas de precipitação com sais, extração líquido-líquido, cromatografias de troca iônica, de filtração em gel e interação hidrofóbica. Onem e Nadaroglu (2014) purificaram a fitase de *Lactarius quietus* em três etapas incluindo a precipitação com sulfato de amônio (40-80%), cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex) e cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200). Os autores alcançaram uma recuperação da enzima de 31,1% e estimaram o tamanho molecular por SDS-PAGE de 45 kDa.

A TABELA 4 apresenta dados da literatura de estratégias de separação sequenciais, tamanho molecular e alguns dados de caracterização bioquímica de enzimas fitases provenientes de macromicetos. Nota-se que a purificação de fitases de macromicetos consiste em mais de uma etapa cromatográfica para a obtenção da enzima purificada. Em média, para a purificação de alta resolução de fitases de macromicetos, são necessárias de 3 a 5 etapas sequenciais de purificação, conforme pode ser visualizado na TABELA 4 que apresenta estudos reportados na literatura.

TABELA 4 - ETAPAS DE PURIFICAÇÃO E ALGUNS DADOS SOBRE CARACTERIZAÇÃO DE FITASES PROVENIENTES DE MACROMICETOS REPORTADAS NA LITERATURA

Macromiceto	Etapas de purificação	Tamanho molecular da fitase (kDa)	Temperatura Ótima (°C)	pH ótimo	Referências
<i>Agaricus bisporus</i>	1- Cromatografia de troca iônica, (resina aniônica <i>Source</i> 30Q FF, GE); 2- Ultrafiltração (amicon 30 kDa); 3- Cromatografia de gel filtração <i>Sephacryl</i> S-200.	531	-	5,5	Collopy e Royse (2004)
<i>Flammulina velutipes</i>	1- Ultrafiltração; 2- Cromatografia de troca iônica: DEAE- <i>cellulose</i> , CM- <i>cellulose</i> , Q- <i>Sephacryl</i> ; 3- Cromatografia por afinidade (Affi-gel <i>blue</i> gel); 4- Cromatografia de gel filtração em sistema FPLC <i>Superdex</i> 75 HR 10/30, GE.	14,8	45	5,0	Zhu et al (2011)
<i>Lentinus edodes</i>	1- Ultrafiltração; 2- Cromatografia de troca iônica: DEAE- <i>cellulose</i> , CM- <i>cellulose</i> e Q- <i>Sephacryl</i> ; 3- Cromatografia por afinidade (Affi-gel <i>blue</i> gel); 4- Cromatografia de gel filtração em sistema FPLC <i>Superdex</i> 75 HR 10/30.	14	37	5,0	Zhang et al (2013a)
<i>Pleurotus eryngii</i>	1- Cromatografia de troca iônica: DEAE- <i>cellulose</i> e CM- <i>cellulose</i> , 2- Cromatografia por afinidade (Affi-gel <i>blue</i> gel); 3- Cromatografia de troca iônica Q- <i>Sephacryl</i> .	14	37	-	Li et al (2013)
<i>Volvariella volvacea</i>	1- Ultrafiltração de 3 kDa; 2- Cromatografia de troca iônica DEAE- <i>cellulose</i> e CM- <i>cellulose</i> ; 3- Cromatografia por afinidade (Affi-gel <i>blue</i> gel); 4- Cromatografia de troca iônica Q- <i>Sephacryl</i> ; 5- Cromatografia de gel filtração com <i>Superdex</i> -75.	14	45	5,0	Xu et al (2012)
<i>Schizophyllum commune</i>	1- Precipitação com sulfato de amônio 70%; 2- Cromatografia de troca iônica: resina DEAE- <i>cellulose</i> , CM- <i>cellulose</i> e Q- <i>Sephacryl</i> ; 3- <i>Superdex</i> 75 em sistema FPLC.	72,5	50	4,6	Zhang et al (2013b)
<i>Peniophora lycii</i>	1- Ultrafiltração 10 kDa;	72	50-55	4,0-4,5	Lassen et al (2001)
<i>Agrocybe pediades</i>	2- Cromatografia de troca iônica resina Q- <i>Sephacryl</i> FF;	58	50	5,0-6,0	
<i>Ceriporia</i> sp.phy A1	3- Cromatografia de interação hidrofóbica <i>Phenyl Toyopearl</i> 650S;	59	55-60	5,5-6,0	
<i>Ceriporia</i> sp.phy A2	4- Cromatografia de gel filtração <i>Sephadex</i> G25;	54	40-45	5,0-6,0	
<i>Trametes pubescens</i>	5- Cromatografia de troca iônica resina <i>Source</i> 30Q.	62	50	5,0-5,5	

FONTE: A autora (2015).

Rodríguez-Fernández e colaboradores (2013) concentraram a fitase produzida por *A. niger* FS3 utilizando o sistema de membranas de ultrafiltração do tipo cassete de fluxo tangencial de porosidade 10 kDa. Os autores atingiram 86,14% de recuperação da enzima e concentraram 4,32 vezes a atividade enzimática. Em purificações de fitases, a ultrafiltração tem sido usada como primeira etapa de purificação de baixa resolução e é considerada eficiente na concentração da enzima.

Salmon e colaboradores (2014b) aplicaram a estratégia de extração líquido-líquido como alternativa para obtenção da fitase parcialmente purificada de *S. commune*. O melhor sistema obtido do planejamento fatorial 2^4 foi citrato de sódio 22% (m/m), PEG 1500 (g mol^{-1}) e pH 7,0 que obteve um rendimento de 367% da enzima. Esse método alternativo pode ser usado como a primeira etapa do processo de purificação de baixa resolução da fitase de *S. commune*.

As cromatografias foram sequenciais em vários estudos publicados na literatura, a maioria seguindo métodos sucessivos até a obtenção da enzima purificada ou parcialmente purificada. Shah e Trivedi (2012) realizaram etapas de purificação sequenciais da fitase produzida por *Aspergillus tamari* utilizando a precipitação com sulfato de amônio (0 a 90%), cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose CL6B e CM-Sepharose CL 6B) e gel filtração (Sephacryl S-200 HR). A recuperação da enzima resultou em 20,3% em relação ao extrato bruto enzimático. Após análise em SDS-PAGE, a massa molecular da fitase foi estimada em 85 kDa.

2.8 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA

As preparações enzimáticas são formulações constituídas por uma ou mais enzimas, com a incorporação de ingredientes ou aditivos, a fim de facilitar o seu *shelf life*, armazenamento, comercialização, padronização, diluição ou dissolução. As preparações enzimáticas devem ser adequadamente caracterizadas e atender aos requisitos de identidade e pureza e às demais especificações constantes pelos órgãos reguladores (ANVISA, 2014).

As características estruturais, bioquímicas (estabilidade à temperatura e ao pH) e a vida útil (ou *shelf life*) devem ser conservadas no produto enzimático bem como manter as características sensoriais e, principalmente microbiológicas. Essas

características devem ser mantidas durante a preparação, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte até a aplicação final do produto. Em geral, a estabilidade as enzimas pode ser alcançada por alguns métodos: adição de aditivos, imobilização de enzimas, engenharia genética e modificações químicas (COSTA et al., 2002; BATISTA, 2014; ROCHA et al., 1998) com o intuito de evitar alterações na atividade catalítica da enzima e proporcionar um maior *shelf life*.

A adição de aditivos em preparações enzimáticas tem mostrado grande potencial, sendo um atrativo para formulações na forma líquida, sólida e granulada. Os aditivos empregados em preparações enzimáticas são sais, açúcares, algumas proteínas, polímeros, antimicrobianos, antioxidantes, entre outros (ZHENG et al., 2011; NORIKO et al., 1999; INADA et al., 1994). Na TABELA 5 estão apresentados alguns estudos citados na literatura sobre o emprego dos aditivos na estabilidade de enzimas. Os aditivos devem auxiliar na manutenção da estrutura conformacional da enzima e assegurar a sua estabilidade e, conseqüentemente, a sua conservação até o limite de utilização fixado, como é o caso dos antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, quelantes e também tamponantes que possibilitam o ajuste do pH (LE HIR, 1997). Apesar disso, esses aditivos podem ter propriedades distintas e, alguns dele apresentam mais de uma propriedade. É o caso do sal acetato de sódio que tem propriedade tamponante, antimicrobiana e estabilizante (ROWE et al., 2009).

O emprego de aditivos também difere conforme a aplicação da enzima. Por exemplo, se a enzima for aplicada na fabricação de um alimento ou em produtos terapêuticos, o aditivo deve ser tecnologicamente justificável e seguro à saúde, como limites da concentração e atóxico. Assim, a estratégia utilizada para o desenvolvimento de formulações enzimáticas devem seguir as propriedades e características de cada bioproduto (ANVISA, 2014).

Durante a etapa de desenvolvimento de fórmulas, os estudos de incorporação de aditivos tornam-se relevantes e avaliam: as interações entre os componentes (incompatibilidades, reações sinérgicas e/ou antagônicas) e, principalmente a associação entre o aditivo e a enzima. Para o estudo de desenvolvimento de formulação e estabilidade enzimática não existe um procedimento geral e/ou padrão. É imprescindível conhecimento físico e químico da interação entre o aditivo

e a enzima tem importância vital quando se propõem novas formulações visto que a sua utilização de forma coerente contribui para evitar interações indesejáveis que possam influenciar na perda de estabilidade da enzima. Um dos maiores desafios é assegurar a estabilidade enzimática evitando a degradação do mesmo nas formulações. A estabilidade refere-se ao tempo de armazenamento e a capacidade de atividade catalítica, devido à decomposição baseado neste tempo, o prazo de validade (*shelf-life*) de um produto é determinado (ICH, 2003).

A estabilidade das enzimas também depende de fatores como temperatura, umidade, luz e de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas e aditivos, forma de apresentação (líquida, sólida e granulada), processo de produção, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2014).

Analizando o comportamento dos aditivos pode-se considerar que numa formulação, os aspectos químicos, a interação entre seus componentes e, conseqüentemente a compatibilidade entre os mesmos, diante de condições adversas de acondicionamento e transporte que devem ser avaliadas. Portanto, a integridade da enzima durante todo seu tempo de vida útil é garantida. Ainda que seja inevitável que as enzimas venham a se degradar dentro dos parâmetros aceitáveis, pode-se, dessa forma, pelo uso de uma correta formulação e condições adequadas de armazenamento, transporte e garantir o *shelf life* das preparações enzimáticas.

TABELA 5 - ESTUDOS SOBRE A ADIÇÃO DE ADITIVOS NA ESTABILIDADE DE ENZIMAS CITADOS NA LITERATURA

Enzima	Aditivos	Referências
catalase	Glicerol e glutaraldeído	Costa et al (2002)
lipase	Benzeno	Inada et al (1984)
α -amilase	Sacarose	Samborska (2007)
xilanase	Sorbitol, manitol e glicerol	George et al (2001)
celulase	Glicerol e albumina	Singh et al (1991)
fitase	PEG 3350	Salmon et al (2012)
protease	Glicerol, manitol, xilitol e sorbitol	Nirmal e Laxman (2014)
lacase	Polivinil álcool	Mohidem e Mat (2012)

FONTE: A autora (2015).

CAPÍTULO II IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ganoderma* sp. MR-56 PRODUTOR DE FITASE

RESUMO

Este estudo teve por objetivo a identificação morfológica e molecular do fungo previamente selecionado como potencial produtor de enzima fitase para o desenvolvimento de um bioprocesso. A identificação morfológica baseou-se na avaliação das características macro e microscópicas tais como formato, coloração, basidioma, píleo, hifas e basidiósporos. A identificação molecular consistiu no sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal da linhagem fúngica por reação em cadeia da polimerase (PCR). O resultado da análise morfológica (macro e microscópica) permitiu a identificação do basidiomiceto *Ganoderma applanatum*. A sequência obtida da identificação molecular foi alinhada com as sequências do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) do mesmo gênero *Ganoderma* sp. A linhagem apresentou 96% de similaridade genética com o macromiceto *Ganoderma applanatum*. Porém, afirmou-se que o fungo pertence ao gênero *Ganoderma* sp., pois a porcentagem obtida neste estudo foi de 96%, reduziu-se assim a probabilidade da espécie ser *applanatum*. Portanto, a sequência foi depositada no *GenBank* (NCBI, USA) como *Ganoderma* sp., MR-56 sob o número de acesso KM658266.

Palavras chave: *Ganoderma* sp., identificação morfológica, identificação molecular, região ITS, PCR.

1 INTRODUÇÃO

A identificação de novos micro-organismos com amplitude para aplicação biotecnológica possibilita o conhecimento das espécies presentes na biodiversidade. É cada vez maior o interesse da capacidade de micro-organismos que podem apresentar valores biotecnológicos (COPLEY, 2000). Diante disso, os fungos dão origem a substâncias de interesse econômico e com algumas espécies são ainda inexploradas.

Cada espécie fúngica pode gerar um cogumelo único e com características particulares. Além disso, os macromicetos, popularmente conhecidos como cogumelos, constituem a classe dos Basidiomicetos e possuem capacidade de produzir substâncias de interesse terapêutico e alimentício. Desta forma, os macromicetos têm atraído a atenção dos pesquisadores em busca de novas espécies presentes na biodiversidade e de novas fontes de bioativos para produtos de interesse comercial.

A identificação do gênero e espécie de um novo micro-organismo requer uma avaliação das características morfológicas e moleculares. O processo de identificação deve considerar características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) ou características sensoriais, tais como o cheiro ou sabor (organolépticas) e ecológicas, e permite descobrir muitas diferenças e variações entre os macromicetos. Porém, tanto em nível micro como macroscópico, os caracteres podem ser variáveis dentro do mesmo grupo microbiano, dificultando assim a delimitação entre as espécies (KUO, 2004). Apesar disso, os cogumelos de uma determinada espécie não apresentam rigorosamente todas as características morfológicas descritas na literatura, pois podem apresentar alterações devido a exposição a fatores ambientais e fatores de crescimento (temperatura, umidade, nutrientes, entre outros).

Pode-se dizer que, indiscutivelmente, a maior concentração de genes no planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. As limitações dos métodos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana e para a identificação de novas

espécies microbianas (ELSAS et al., 1998). Para uma maior precisão na identificação taxonômica microbiana, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais destacam-se aquelas baseadas nos ácidos nucleicos (EMBRAPA, 2002; ELSAS et al., 1998; SAIKI et al., 1985; GOMES, 2011). Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (reação de cadeia da polimerase). Esta técnica, descrita por SAIKI e colaboradores (1985), permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. A técnica de PCR apresenta vantagens, como a facilidade e a rapidez em sua execução. A sequência gênica, mais frequentemente utilizada para a identificação fúngica, inclui os genes que codificam para o RNA ribossomal (rRNA). Inclui regiões muito conservadas como os genes de rDNAs e também sequências de DNA hipervariáveis como a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Portanto, as regiões ITS apresentam uma elevada variação intra-específica e com importância na identificação molecular em estudos de taxonomia de fungos (IWEN et al., 2002; ALVES et al., 2007; GOMES, 2011).

Assim, a identificação molecular proporciona elementos adicionais para uma identificação precisa e segura. Nesse estudo, sugere-se que a combinação de identificação morfológica e molecular poderão fornecer informações úteis para a adequada identificação do gênero e a espécie fúngica em estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO

A linhagem fúngica utilizada nesta pesquisa encontra-se depositada no Banco de Cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. O macromiceto *Ganoderma* sp. MR-56 utilizado para a identificação teve origem e isolamento de seu basidiomata (basidiocarpo) e coleta no Parque Barigüi (Curitiba, PR, Brasil). O fungo foi previamente descontaminado e cultivado em placa de Petri contendo meio PDA (*Potato Dextrose Ágar*) a 30°C por cinco dias. A seleção prévia de linhagens de macromicetos com potencial para a produção de

fitases foi realizada por Salmon (2012) em FES utilizando farelo de trigo como substratos/suporte. As cepas dos gêneros *Ganoderma* sp., *Trametes* sp., *Pleurotus* sp., *Schyzophillum* sp., *Coriollus* sp., *Grifola* sp., *Lentinus* sp. e outras linhagens de macromicetos isoladas porém não identificadas também foram utilizadas nesse estudo e o *Ganoderma* sp. foi selecionado para estudo nesta tese.

2.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

A linhagem do presente estudo foi analisada macro e microscopicamente em relação às suas características morfológicas com o objetivo de identificar o gênero e espécie. A identificação taxonômica do cogumelo fresco foi realizada pelo pesquisador André August Remi de Meijer. A análise macroscópica incluiu forma, tipo do basidioma, formato do píleo, características da superfície (coloração, pilosidade e espessura). As características microscópicas foram determinadas com o auxílio do microscópio monocular Ernst Leitz Wetzlar® provido de objetivas 10X, 50X e 100X. Foram analisadas as hifas, basidiósporos (forma, tamanho e coloração) e tipos de basídios.

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Após o crescimento micelial em meio PDA (conforme descrito no subitem 2.1), 100 mg do micélio foi transferido assepticamente com auxílio de uma alça de platina para microtubos de polipropileno de 2 mL previamente esterilizados. Cada microtubo continha 1800 µL de água destilada esterilizada. Os microtubos foram aquecidos à 60°C e agitados em vórtex (Phoenix, Brasil) durante dois minutos. Foram realizados três ciclos de lavagem do micélio. No término de cada lavagem, a biomassa micelial foi centrifugada a 4.000 g por 1 min a temperatura ambiente. A água de lavagem foi descartada e o micélio lavado foi transferido para outro microtubo esterilizado. Cada microtubo continha 1,5 g de *beads* de quartzo (previamente esterilizados *overnight* em mufla a 540°C para a incineração do material orgânico) e 600 µL de tampão CTAB a 2% para a extração de DNA de acordo com a modificação (ver composição da solução tampão na TABELA 6) conforme Sánchez-Hernández e Gaytán-Oyarzún (2006). O rompimento da parede celular micelial foi

realizado por método físico, com cisalhamento causado pelos *beads* de quartzo em agitação contínua de 3 minutos em agitador do tipo vórtex (Phoenix, Brasil) na potência máxima.

O material pulverizado foi solubilizado em 350 µL de tampão CTAB e submetido a dois ciclos de congelamento e descongelamento (ultrafreezer a -80°C / 2 min seguido de descongelamento em banho-maria à 75°C / 2 min). Para a purificação do DNA, seguiu-se método descrito por Sambrook e colaboradores (1987), adicionando-se 1 volume de solução de fenol/clorofórmio/isoamílico (25:24:1) para a remoção de proteínas. O material foi centrifugado a 13.200 g / 10 min. O procedimento foi repetido até a fase aquosa permanecer límpida.

A precipitação do DNA foi realizada com 2,5 volumes de etanol absoluto P.A., seguida de centrifugação a 12.000 g / 15 min à 4°C. O DNA precipitado foi então lavado com 300 µL de etanol a 70% v/v P.A. e novamente submetido à centrifugação (12.000 g / 15 min). Posteriormente, o etanol foi evaporado em estufa à 37 °C *overnight*. O DNA foi ressuspenso com água ultra pura para realização de uma corrida eletroforética em gel de agarose para analisar o aparecimento de bandas de DNA. Após esse procedimento, o DNA extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C. O material foi diluído nas proporções de 1:5; 1:10, 1:20 em água ultra pura, etapa que precede a amplificação para evitar inibição de amplificação por excesso de DNA.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO CTAB 2% DE EXTRAÇÃO DO DNA DE *Ganoderma* sp.

Reagentes	Concentração
CTAB	2%
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
Cloreto de sódio	1,4 M
PEG 8000	1%
EDTA pH 9,5	20 mM
β-mercaptoetanol	0,3%

2.3.1 Amplificação das regiões ITS 1 e ITS 2 do rDNA

Dois iniciadores (*primers*) específicos utilizados para eucariotos foram adquiridos da empresa Invitrogen™ (USA): o *primer* ITS-5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG e o ITS-4 TCCTCCGCTTATTGATATGC,

direção da sequência 5'→3', baseiam-se no manual de alinhamento da região ITS (COOKE et al., 2000; BELLEMAIN et al., 2010). Para a amplificação do DNA em PCR, foi adicionado em cada microtubo 2 µL de DNA mol contendo uma solução reagente com 0,4 µL dNTPs 10 mM, MgCl₂ 50 mM, 1,25 unidades (U) de *Taq* Polymerase, 0,65 µL ITS 4 *reverse* e 0,65 µL ITS 5 *forward*, 2,0 µL de tampão Tris-HCl pH 8 10X e 14 µL de água ultra pura.

Todas as reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems®, USA) com desnaturação inicial a 95°C / 10 min. Em seguida, a reação da polimerase em cadeia foi conduzida com 30 ciclos de desnaturação (95°C / 30 segundos), anelamento (46°C / 2 min) e extensão (72°C / 2 min), seguidos de uma extensão final de 72°C / 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em um gel de agarose a 1,2% m/v com o marcador de massa molecular 1kB (Invitrogen™, USA). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV (Loccus Biotecnologia, Brasil).

2.3.2 Purificação de DNA para reação de sequenciamento

Os produtos de amplificação foram purificados por precipitação com acetato de amônio e armazenados a -20°C. Em um microtubo de 500 µL foram adicionados 45 µL do produto de PCR, 30 µL de acetato de amônio 7,5 M (microfiltrado em 0,22 µm) e 90 µL de etanol absoluto. O material foi homogeneizado em agitador tipo vórtex e centrifugado a 13.000 g / 20 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado para a obtenção do *pellet*. Em seguida foram gotejados lentamente 200 µL de etanol 70% (v/v), seguido de uma centrifugação a 13.000 g / 15 min à temperatura ambiente, o qual (sobrenadante) foi descartado após este procedimento. O material amplificado foi seco em estufa à vácuo à 45°C (10 a 15 min) e então dissolvido em 20 µL de água ultra pura. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) com 3 µL do DNA purificado para avaliação da eficiência do procedimento de purificação e subsequente envio para reação de sequenciamento.

2.3.3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). Foi utilizado o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®, USA). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 4,5 pmol ou do *primer* ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e do *primer* ITS 5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3') e 3 µL do reagente *Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial à 96°C / 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C / 10 segundos, 55°C / 5 segundos e 60°C / 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems, USA), desnaturados à 95°C / 5 min, resfriados em banho de gelo por 5 min e eletro-injetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems, USA) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

Os resultados da identificação macro e microscópica realizada pelo pesquisador André August Remi de Meijer mostram que "*As características do Ganoderma applanatum são: basidioma lignícola e séssil (não tem pecíolo ou haste), píleo liso com superfície coloração marrom e margem coloração creme. Sistema hifálico dimitico, com hifas não amilóides e não dextrinóides. Basidiósporos ovóides e cilíndricos, truncados na região terminal, de parede dupla e coloração marrom*" (André August Remi de Meijer, comunicação pessoal; RAJCHENBERG e MEIJER, 1990).

A espécie *Ganoderma australe* pode ser facilmente confundida com *Ganoderma applanatum*, porém microscopicamente as duas espécies podem ser diferenciadas a partir do tamanho dos basidiósporos, onde *Ganoderma australe* possui basidiósporos de maior comprimento e menor largura quando comparados aos da espécie *Ganoderma applanatum* (VIEIRA et al., 2006). Para a confirmação do gênero e espécie, a identificação molecular do macromiceto foi realizada e os resultados são reportados a seguir.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.2.1 Análise de sequenciamento de DNA

A sequência de nucleotídeos obtida do fungo em estudo foi alinhada com sequências referentes ao gênero *Ganoderma* sp. depositadas no banco de dados do *GenBank* (NCBI, 2014) e o alinhamento resultou em 96% de similaridade com o *Ganoderma applanatum* (região 5.8S do RNA ribossomal e sequência gênica parcial do 28S RNA ribossomal, TABELA 7). Pode ser afirmado que o basidiomiceto pertence ao gênero *Ganoderma* sp. porém, como a porcentagem obtida neste estudo foi de 96%, reduziu-se assim a probabilidade da espécie ser *applanatum*. Para a confirmação conclusiva da espécie, recomenda-se que mais regiões ITS do DNA ribossomal da linhagem fúngica sejam realizadas para a tentativa de se obter maior similaridade genética (recomendada acima de 98%) e confirmação da mesma (CHENG et al., 2014). A sequência foi depositada no *GenBank* (NCBI, USA) sob o número de acesso KM658266. A TABELA 7 apresenta o alinhamento da sequência parcial do DNA ribossomal da linhagem fúngica em estudo.

TABELA 7 - RESULTADO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DE *Ganoderma* sp. Informações relacionadas ao alinhamento da sequência gênica parcial do 5.8S do RNA ribossomal e sequência gênica parcial do 28S RNA ribossomal (*Ganoderma applanatum* voucher BAFC:1168 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: gb|HM602034.1|Length: 536 Number of Matches: 1Range 1: 53 to 401 GenBank Graphics Next Match Previous Match)

Informações do Alinhamento da Sequência Gênica Parcial (GenBank, NCBI, 2014)					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	554 bits (614)	5e-159	336/349 (96%)	6/349 (1%)	Plus/Plus
Query 167	109	CTTTCCTTATGTTT-ACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTTTACTGTGTATAACACAAT			
Sbjct 112	53	CTTTCCTTATGTTTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTCAACTGTGTATAACACATT			
Query 227	168	TATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA			
Sbjct 172	113	TATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA			
Query 287	228	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG			
Sbjct 232	173	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG			
Query 347	288	CACTCCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTTGAGTCTCATGGAATTCTCAACCCCTAA			
Sbjct 292	233	CACTCCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTTGAGTCTCATGGTATTCTCAACCCCTAA			
Query 402	348	A-TTTTGTAATGAA-GTTTAGTGGGCTTGGACTTGGAGGTTGTGTCTGG--CTTCT-AGTC			
Sbjct 352	293	ATTTTGTGAATGAAGGTTTAGCGGGCTTGGACTTGGAGGTTGTGTCTGGCCCTTGTCTGGTC			
Query 403	403	GACTCCTCTGAAATGCATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCAGTGT 451			
Sbjct 353	353	GACTCCTCTGAAATGCATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCAGTGT 401			

Fonte: Banco de dados do *GenBank* (NCBI, 2014).

4 CONCLUSÃO

O fungo identificado no presente estudo pertence à classe Basidiomycota (basidiomiceto) e ao gênero *Ganoderma* sp. com base nos critérios morfológicos e moleculares. A partir da identificação molecular foi possível confirmar o gênero *Ganoderma*. Porém, a espécie não foi confirmada pela identificação molecular visto que a porcentagem de similaridade genética foi inferior (96%) ao indicado para a confirmação de uma espécie (> 98%). Deste modo, sugere-se que outras regiões ITS do rDNA sejam analisadas para a confirmação da identificação da espécie do *Ganoderma* sp. utilizado no desenvolvimento da presente tese. A sequência foi depositada no *GenBank* (NCBI, USA) sob o número de acesso KM658266.

CAPÍTULO III ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO

RESUMO

O propósito deste capítulo foi inicialmente avaliar a influência das suplementações no meio de cultivo para o possível aumento de produção de fitases e otimização da suplementação do meio (estudos prévios) e de alguns parâmetros físico-químicos com o auxílio de ferramentas estatísticas. Os estudos de incremento da produção de fitases por cultivo submerso em extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado iniciaram-se com a suplementação de fontes de carbono, nitrogênio e minerais, realizados separadamente. Nesses estudos preliminares de suplementação do meio, o melaço de cana 6%, o extrato de levedura 2% e o CaCl_2 1 mM incrementaram a produção de fitases em 80,95%, 95% e 36,43%, respectivamente em relação ao controle (extrato de farelo de trigo 20% m/v tratado sem nenhuma suplementação no meio). A otimização da suplementação do meio e de alguns parâmetros físico-químicos foram realizadas utilizando dois planejamentos experimentais, o delineamento composto central rotacional (DCCR). A primeira etapa da otimização do bioprocessos foi a suplementação do meio com as seguintes variáveis: melaço de soja, extrato de levedura e CaCl_2 . A segunda etapa consistiu na seleção de variáveis (temperatura de cultivo, pH e taxa de inoculação) que também afetaram a produção da enzima. Após realizadas as duas etapas, a maior produção foi de $14,5 \text{ U mL}^{-1}$ de fitase com um aumento de 5,8 vezes em relação ao extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado sem suplementação, obtidas utilizando as condições otimizadas: extrato de levedura 8% (m/v), temperatura de cultivo 30°C , pH inicial 6,0 e taxa de inoculação de 3% (v/v).

Palavras-chave: fitase, farelo de trigo, cultivo submerso, otimização.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas fitases podem ser produzidas por bioprocessos a partir de micro-organismos. Os fungos são as fontes microbianas mais promissoras devido às suas fitases apresentarem maior estabilidade térmica e maior estabilidade em uma faixa ampla de pH, quando comparadas com as fitases de outras origens (MONTEIRO, 2011; BOHN et al., 2008; TAHIR et al., 2010).

A utilização de ferramentas estatísticas para a otimização de bioprocessos apresenta-se como uma alternativa para otimizar os fatores que influenciam uma determinada resposta (resultado), bem como as possíveis interações entre as variáveis. A otimização de um bioprocessos visa reduzir tempo, número de experimentos, gastos com materiais e reagentes, com concomitante obtenção de um ponto ou região ótima do resultado ou resposta esperada.

A produção industrial de enzimas é limitada devido aos custos de produção envolvidos nas etapas dos processos fermentativos. Estima-se que aproximadamente 40% do custo total pode estar relacionado ao meio de cultivo utilizado para a fermentação. Portanto, o uso de um subproduto agroindustrial e sua otimização são de grande importância para a redução dos custos de produção (JOO e CHANG, 2005). Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de fitases, devido à representação de uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção dessas enzimas em larga escala. De modo geral, nos últimos anos, o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais vem aumentando a cada ano. Estudos de Salmon e colaboradores (2012) evidenciaram a otimização das variáveis (temperatura de cultivo, concentração de sacarose, extrato de levedura, pH e taxa de inoculação) da FES com aplicação estatística do Box-Behnken *design* para produção de fitase de *S. commune* com farelo de trigo como substrato. Os autores obtiveram um aumento de 2,85 vezes no processo e produção de $113,7 \text{ U g}^{-1}$ quando comparado ao processo sem otimizar. Moreira e colaboradores (2014) utilizaram resíduo de mandioca para otimização da síntese de fitase de *A. japonicus* URM 5633, alcançando 174 U g^{-1} de enzima em 96 horas por FES.

Os processos fermentativos são influenciados significativamente por parâmetros físicos e químicos. Para o desenvolvimento do bioprocesso da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 foram realizados estudos de suplementação do meio com fontes de carbono, nitrogênio e minerais. Em seguida, os nutrientes que aumentaram a produção da enzima foram empregados nos planejamentos experimentais do tipo DCCR.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de suplementações no meio de cultivo e otimizar algumas condições físico-químicas do bioprocesso para a produção de fitases de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso utilizando o extrato aquoso de farelo de trigo como substrato e a metodologia de superfície de resposta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo *Ganoderma* sp. MR-56 foi previamente selecionado (conforme descrito no subitem 2.1 do capítulo II) e obtido da coleção de culturas do laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. O micro-organismo foi repicado em placas de Petri contendo meio PDA (ágar de batata dextrose) previamente esterilizado em autoclave à 121°C, 1 atm e por 15 minutos. Para a manutenção do fungo, foram realizados repiques a cada 30 dias. A partir das placas, o basidiomiceto foi repicado na forma de fragmentos de tamanho 10 mm por 10 mm de micélios, em outras placas de Petri contendo o mesmo meio PDA previamente esterilizado. As placas de Petri foram incubadas em estufa à 30°C durante 7 dias. Após o crescimento do micélio (análise visual), as placas foram armazenadas sob refrigeração (4°C).

2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO SUBMERSO

A seleção prévia de substratos foi realizada por Salmon (2012) que teve como objetivo avaliar a capacidade *Ganoderma* sp. MR-56 em sintetizar a fitase. O substrato farelo de trigo, subproduto agroindustrial, apresenta um considerável teor de ácido fítico e um potencial indutor para a produção de

fitases (SALMON et al., 2012; SPIER et al., 2008), escolhido dentre outras fontes. Neste estudo os substratos utilizados foram extratos de farelo de trigo, casca de soja, casca de café, centeio, milho, arroz, polpa cítrica, manipueira e melaço de cana. O experimento foi realizado utilizando 20% (m/v) de farelo de trigo em água (20 gramas do substrato e 80 mL de água), tratado termicamente à 100°C por 20 minutos e, posteriormente, filtrado em tecido TNT.

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA CULTIVO SUBMERSO

O extrato aquoso do farelo de trigo preparado conforme descrito no subitem 2.2 foi conduzido a um pré-tratamento para reduzir a contaminação microbiana, pois a esterilização (em autoclave) provoca a degradação do ácido fítico. Portanto, o extrato aquoso foi submetido ao tratamento térmico conforme Salmon e colaboradores (2012). Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de extrato de farelo de trigo a 20% (m/v) para o cultivo submerso. O pH inicial do extrato foi de 6,0.

2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

O *Ganoderma* sp. MR-56 foi inoculado em meio líquido seletivo denominado Czapek modificado (glicose 30 g, extrato de levedura 6 g, fosfato de potássio monobásico 1 g, sulfato de magnésio 0,5 g, sulfato de ferro 0,01 g para 1 litro de meio de cultivo), pH ajustado 6,0 e previamente esterilizado. Utilizaram-se 4 fragmentos de micélio (10 mm por 10 mm) em 100 mL do meio em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram então incubados em um agitador orbital tipo *shaker* (Tecnal, TE-420) à 30°C, 120 rpm, por cinco dias. Após a formação dos *pellets*, eliminou-se o excesso do meio líquido, e esses foram rompidos com uma espátula previamente esterilizada de modo a obter uma suspensão homogênea de fragmentos de micélio. O estudo da taxa de inoculação foi conduzida conforme descrito no subitem 2.8.

2.5 PRODUÇÃO DE FITASES POR CULTIVO SUBMERSO

Os experimentos de cultivo submerso foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado e pH 6,0. Os frascos foram inoculados com a

suspensão de micélio (*pellets*) de *Ganoderma* sp. MR-56 e foram incubados em agitador do tipo *shaker* (Tecnal, TE-420) 120 rpm e à 30°C. Os cultivos foram realizados em duplicata e os ensaios enzimáticos (subitem 2.6) em triplicata.

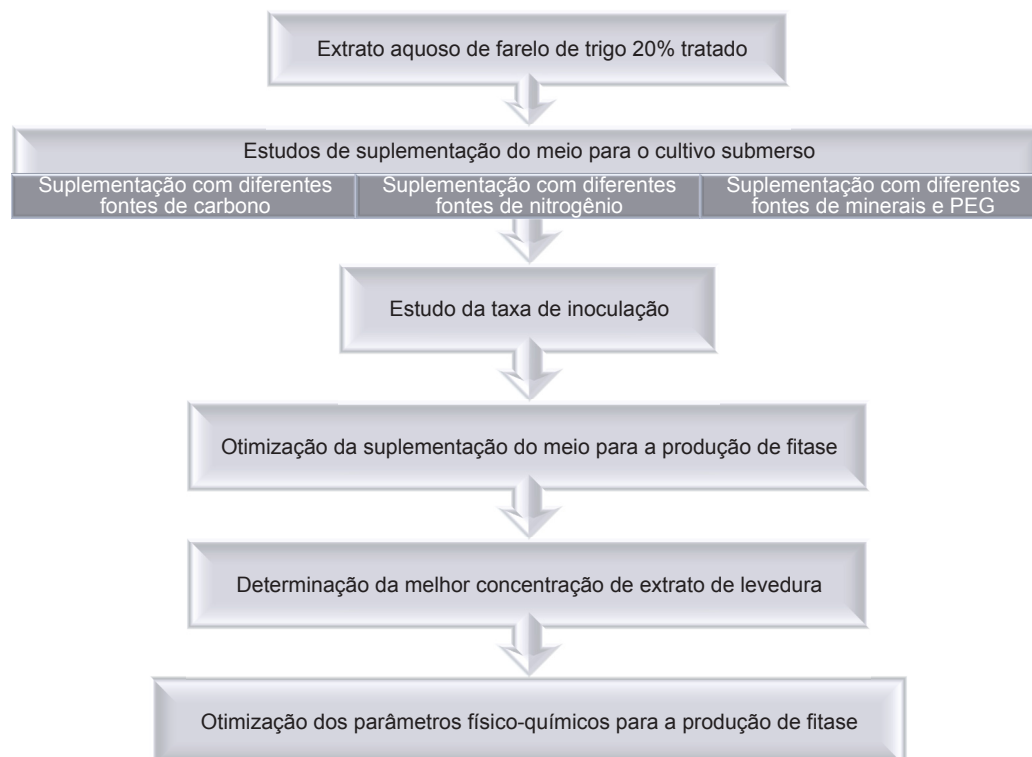
2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FITASE

A determinação da atividade da enzima fitase foi medida pela liberação de fósforo inorgânico de acordo com a metodologia descrita por Heinonen e Lahti (1981) com algumas modificações, expressa em U mL⁻¹ (Unidades por mL). Uma unidade de atividade de fitase (U) representa a liberação de 1 µmol de fosfato inorgânico (KH₂PO₄) por minuto.

2.7 FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE

Neste capítulo foi realizado variados estudos para o incremento da produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso. Os estudos propostos foram conduzidos pelas seguintes etapas: estudos de suplementação do meio de cultivo (suplementação com diferentes fontes de carbono, suplementação com diferentes fontes de nitrogênio e suplementação com diferentes fontes de minerais e PEG); estudo da taxa de inoculação; otimização da suplementação do meio de cultivo; determinação da melhor concentração de extrato de levedura; otimização dos parâmetros físico-químicos. A FIGURA 4 apresenta o fluxograma dos estudos de suplementação do meio para otimização do bioprocessamento de produção de fitase.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE



2.7 ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA O CULTIVO SUBMERSO

2.7.1 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de carbono

O estudo da suplementação do meio com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, melaço de cana e melaço de soja) objetivou avaliar um possível incremento na produção da enzima durante o cultivo submerso. A concentração de cada fonte foi calculada a partir do número de átomos de carbono. Padronizou-se para que todos os ensaios apresentassem a mesma concentração de carbono a 5 g mol^{-1} . Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7.2 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio

O estudo foi realizado para avaliar a influência da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio durante o cultivo submerso para o possível incremento da produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56. As fontes de nitrogênio avaliadas foram ureia, citrato de amônio, peptona, triptona, extrato

de malte e extrato de levedura. A concentração de cada fonte foi determinada a partir do número de átomos de nitrogênio e padronizada para que todos os ensaios apresentassem 2 g mol^{-1} . Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7.3 Avaliação da suplementação de minerais e do polímero PEG no cultivo submerso

Alguns íons metálicos na forma de seus sais foram testados para o estudo da avaliação da produção da fitase em cultivo submerso: KCl, CaCl_2 , MgSO_4 , Na_2SO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 e PEG 3350 (surfactante) na concentração final de 1 mM conforme Salmon e colaboradores (2012). Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.8 ESTUDO DA TAXA DE INOCULAÇÃO

O estudo da concentração da biomassa úmida de *Ganoderma* sp. MR-56 proveniente do cultivo líquido em meio Czapek foi realizado para a inoculação do meio de cultivo (subitem 2.5) nas seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (v/v), contendo extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado. Realizou-se este estudo para padronizar o volume de *pellets* inoculados no meio de cultivo submerso para a produção de fitase.

2.9 OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO

2.9.1 Otimização da suplementação do meio para a produção de fitase em cultivo submerso

Baseado nos estudos preliminares de suplementação do meio de fonte de carbono, nitrogênio e minerais, a primeira etapa de otimização do bioprocessos foi definido um planejamento experimental do tipo DCCR com três variáveis previamente estudadas (melaço de soja, extrato de levedura e cloreto de cálcio), dois níveis, seis pontos axiais e quatro pontos centrais, totalizando 18 ensaios. Os níveis utilizados para cada variável estão apresentados na TABELA 8. Os experimentos em cultivo submerso foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL do extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado, pH 6,0,

temperatura 30°C, agitação de 120 rpm e suplementados com as quantidades apresentadas na TABELA 8. Amostras foram retiradas após 96 horas de cultivo para análise enzimática. O *software* “STATISTICA 5.0” (Stasoft Inc, EUA) foi utilizado para a obtenção do planejamento experimental e análise estatística dos resultados.

TABELA 8 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA, EXTRATO DE LEVEDURA E CaCl_2 DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de soja (%)	0	2,43	6	9,57	12
Extrato de levedura (%)	0	0,81	2	3,19	4
CaCl_2 (mM)	0	4,05	10	15,95	20

2.9.2 Determinação da melhor concentração de extrato de levedura

Com base nos resultados da etapa anterior, determinou-se a melhor concentração de extrato de levedura adicionado ao extrato do farelo de trigo 20% (m/v) tratado para a produção de fitases por cultivo submerso. As concentrações utilizadas de extrato de levedura foram: 4, 6, 8 e 10% (m/v). Uma condição controle também foi analisada, sem a adição de extrato de levedura. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.9.3 Otimização dos parâmetros físico e químicos para a produção de fitase por cultivo submerso

A segunda etapa de otimização do bioprocessamento para a produção de fitases consistiu em avaliar alguns parâmetros físico-químicos e possíveis interações entre as variáveis utilizando um planejamento experimental do tipo DCCR, sendo três variáveis, dois níveis, seis pontos axiais e quatro pontos centrais, totalizando em 18 ensaios. As variáveis estudadas foram pH, temperatura e taxa de inoculação. Os níveis das variáveis utilizados estão apresentados na TABELA 9. Os cultivos submersos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do extrato do farelo de trigo 20% (m/v) tratado. O *software* “STATISTICA 5.0” (Stasoft Inc, EUA) foi utilizado para a obtenção do planejamento experimental e análise estatística dos resultados.

TABELA 9 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E TAXA DE INOCULAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	2,63	4	6	8	9,36
Temperatura (°C)	25	27,05	30	32,97	35
Taxa de inoculação (%)	1	1,81	3	4,19	5

2.10 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DO FARELO DE TRIGO

As análises físico-químicas do extrato de farelo de trigo 20% (m/v) e do extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado (conforme os subitens 2.2 e 2.3) e otimizado (extrato de levedura 8% (m/v), pH 6,0 e temperatura 30°C) foram realizadas. As amostras foram analisadas pelo Laboratório de Nutrição Animal da UFPR e os parâmetros avaliados foram: resíduo mineral (AOAC, 1995), umidade, pH (método potenciométrico, pHmetro), proteínas (pelo método de Kjeldhal, AOAC, 1995), extração de lipídeos pelo método Soxhlet (AOAC, 1990) e carboidratos (açúcares totais, DUBOIS, 1956). Os métodos analíticos seguiram o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2009.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDOS DE SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA O CULTIVO SUBMERSO

Em todos os estudos de suplementação do meio para o cultivo submerso as atividades enzimáticas foram representadas por atividade relativa de fitase, considerando que o experimento controle continha 100% de atividade relativa de fitase em relação aos experimentos suplementados.

3.1.1 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de carbono

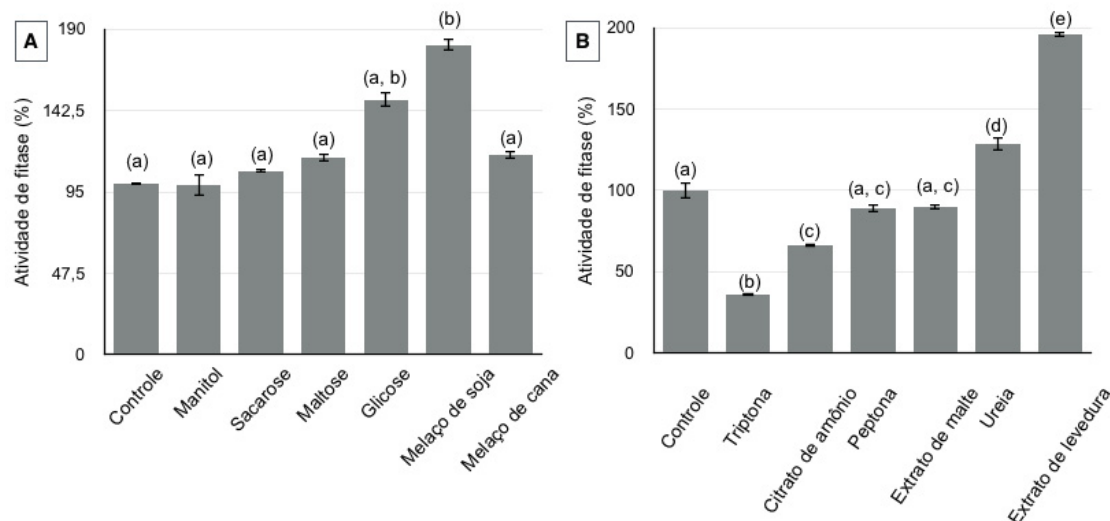
A suplementação do meio de cultivo submerso com diferentes fontes de carbono resultou em um incremento na produção de fitase quando comparada ao experimento controle. Os resultados desse estudo estão apresentados na FIGURA 4. Houve um aumento de 80,95% na produção de fitase quando suplementado o meio com o melaço de soja 6% comparado com o controle

(sem adição de fonte de carbono). O melaço de soja 6% foi a fonte de carbono selecionada para estudos posteriores de otimização do bioprocesso. Conforme Sella e colaboradores (2013), o melaço de soja é um resíduo complexo composto de carboidratos de peso molecular elevado (glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose e estaquiose), proteínas e lipídeos. Sugere-se que este subproduto contribuiu para o incremento da produção de fitase, visto que possui variadas fontes nutricionais, bem como uma relação C/N mais equilibrada. A suplementação com glicose também apresentou um aumento significativo de 49% na produção de fitase comparado com a produção do experimento controle. A atividade enzimática apresentou um ligeiro aumento com a suplementação de melaço de cana (16,7%), maltose (15,1%) e sacarose (7,3%) em relação ao controle.

Usando *Tukey's multiple comparisons test* como ferramenta estatística para avaliar a diferença entre os experimentos, o melaço de soja foi a única fonte de carbono testada no estudo de suplementação do meio que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de fitase, quando comparado às outras fontes de carbono e ao controle, com exceção da glicose (FIGURA 5 A).

Dados reportados na literatura indicam que a produção de fitase por *Bacillus* sp. C43 em FSm utilizando farelo de trigo, suplementado com glicose e sacarose, aumentou a síntese da enzima resultando em 0,52 e 0,59 U mL⁻¹ respectivamente (SREEDEVI e REDDY, 2012). Os resultados positivos condescendem com Singh e Satyanarayana (2012) que observaram o aumento da produção da fitase (aproximadamente 146%) de *S. thermophile* com a adição da glicose. Um efeito similar foi encontrado nos estudos de Nampoothiri e colaboradores (2004) que aumentaram 331% a produção de fitase de *Thermoascus auranticus* em FSm com a adição de farelo de trigo 3,75% (m/v) em relação ao meio sem suplementação.

FIGURA 5 – A: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SUBMERSO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE POR *Ganoderma* sp. MR-56. B: ESTUDO DE SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO DURANTE O CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR *Ganoderma* sp. MR-56. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$) E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)



3.1.2 Estudo de suplementação do meio com diferentes fontes de nitrogênio

A FIGURA 5 B apresenta os resultados da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio (ureia, citrato de amônio, extrato de levedura, extrato de malte, peptona e triptona) testadas na produção de fitase em cultivo submerso de *Ganoderma* sp. MR-56. Dentre esses, o extrato de levedura 2% proporcionou um incremento de 95% na produção de fitase em comparação ao controle (sem adição de fonte de nitrogênio). A ureia também aumentou a produção de fitase em 28,2%. Porém, o citrato de amônio, a peptona e o extrato de malte reduziram a produção de fitase em 33,53%, 11% e 10% respectivamente, em relação ao experimento controle.

Com o auxílio da ferramenta estatística *Tukey's multiple comparisons test* foi possível avaliar a diferença entre os experimentos, e verificou-se que o extrato de levedura apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado com as outras fontes de nitrogênio e ao controle. A ureia também apresentou diferença significativa entre si (FIGURA 5 B). O extrato de levedura foi selecionado para estudos posteriores para a produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56.

Segundo Shamna e colaboradores (2012) a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura para síntese de fitase de *B. subtilis* BPTK4 com um

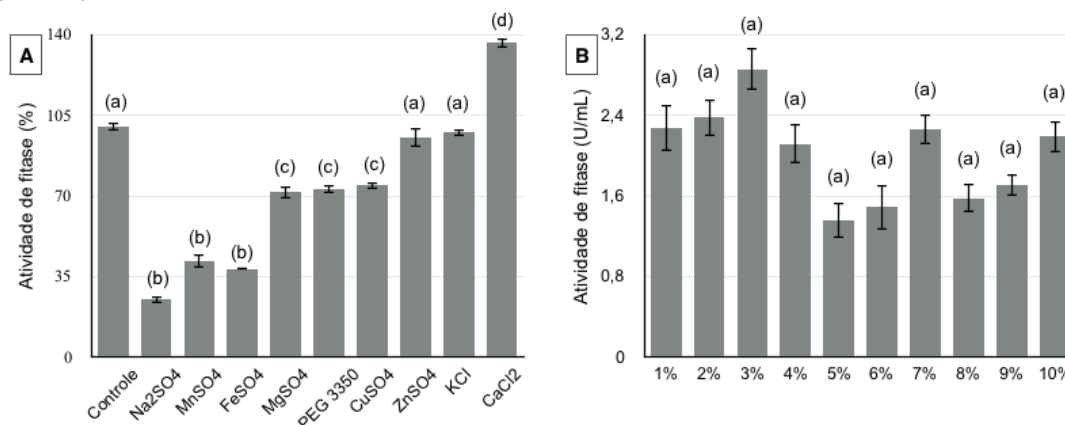
aumento de aproximadamente 38% em relação ao controle. Nos estudos de Vats e Banerjee (2002), em contraste, a peptona aumentou a produção de fitase (aproximadamente 127%) de *Aspergillus niger* var teigham em FSm. Por outro lado, a ureia aumentou 11,2 vezes a produção de fitase de *Klebsiella* sp. DB-3 FJ711774.1 em FSm (MITTAL et al., 2012).

3.1.3 Avaliação da suplementação de minerais e do polímero PEG no cultivo submerso

Os íons metálicos selecionados foram adicionados no meio de cultivo para avaliação do incremento na síntese da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56. Dentre eles, o melhor sal foi CaCl_2 que aumentou em 36,43% a produção de fitase em comparação ao controle (sem suplementação de minerais). Uma hipótese seria que o cálcio pode ser co-fator da fitase. Porém, PEG 3350, Na_2SO_4 e MnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 e KCl mostraram uma diminuição na atividade de fitase durante o cultivo submerso. De acordo com a análise estatística *Tuckey test*, todos os íons metálicos testados foram significativos entre si, com exceção do controle *versus* ZnSO_4 e controle *versus* KCl. Os resultados estão apresentados na FIGURA 6 A.

Segundo Gunashree e Venkateswaran (2008), o CaCl_2 a 0,01% também estimulou a produção da fitase mais que 55% em relação ao controle em FSm por *Aspergillus niger* CFR 335, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Sreedevi e Reddy (2012) suplementaram o meio fermentativo com íons metálicos e somente o Ca^{2+} a 5mM que aumentou a atividade de fitase de *Bacillus* sp. C43. Os mesmos autores ressaltam que o Ca^{2+} pode ter contribuído para a ativação da enzima, podendo auxiliar na permeação e ativação dos canais de íons na membrana celular. No entanto, a diminuição na produção da fitase na presença de outros íons metálicos pode ser atribuída a efeitos inibitórios na estrutura da enzima ou durante a reação enzimática (SREEDEVI e REDDY, 2012). Sharma (2012) descreveu que a inibição não-competitiva pode ser influenciada por íons metálicos ligados em determinados sítios ativos da enzima como na formação do complexo enzima-substrato. A ligação do inibidor não bloqueia a ligação do substrato, mas pode provocar uma modificação da conformação da enzima que evita a formação de produto.

FIGURA 6 – A: ESTUDO DE SUPLEMENTAÇÃO DE MINERAIS E DO POLÍMERO NO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE FITASE POR *Ganoderma* sp. MR-56. B: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE INOCULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FITASE DURANTE O CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma* sp. MR-56. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$) E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)



3.2 ESTUDO DA TAXA DE INOCULAÇÃO

O estudo de diferentes concentrações de inóculo foi realizado para avaliar a sua influência na produção de fitase durante o cultivo submerso por *Ganoderma* sp. MR-56 (FIGURA 6 B). Os inóculos foram provenientes de cultivo líquido em meio Czapek modificado (item 2.4) com idade de cinco dias. Dentre as concentrações de inóculos estudadas a que apresentou maior produção de fitase foi com taxa de inoculação de 3% (v/v) em cultivo submerso, sendo esta definida para os estudos posteriores para a produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56. Utilizando a ferramenta estatística *Tukey's multiple comparisons test* foi demonstrado que nenhuma das taxas de inoculação apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Observou-se que o aumento da taxa de inoculação não foi proporcional ao aumento da produção de fitase, mas houve uma diminuição da produção da enzima em concentrações de inóculo acima de 4% (v/v). Sabu e colaboradores (2002) relataram que a taxa de inoculação é um importante parâmetro durante a síntese de fitase na FES por *R. oligosporus*. De acordo com Pandey (1994), a taxa de inoculação desempenha um papel significativo na produção de metabólitos durante a fermentação. A qualidade do inóculo (idade, morfologia, condições de cultivo temperatura, agitação) também são parâmetros importantes que podem influenciar a fermentação fúngica (PARTON, 1990; PAPAGIANNI et al., 2001).

Salmon e colaboradores (2012) usaram 7,5% de biomassa (m/m) de *S. Commune* em FES. Os resultados de Singh e Satyanarayana (2012) corroboram com esse estudo, indicaram que níveis de inóculo podem influenciar positivamente o crescimento microbiano, bem como a produção enzimática. Taxas elevadas de inoculação promoveram uma diminuição na síntese da enzima, devido à quantidade de biomassa inoculada e o maior consumo de nutrientes durante a fermentação. Georgiev e colaboradores (2013) usaram 6,6% de inoculação de *Candida melibiosica* 2491 para a produção máxima de atividade de fitase. Outros relatos na literatura indicaram que a melhor taxa de inoculação foi de 1,5% de *Klebsiella sp.* para produção de fitase (MITTAL et al., 2012). Contudo, a escassez de dados sobre taxa de inoculação de microrganismos para síntese de fitases ainda são limitados na literatura, o que dificulta a comparação com outros trabalhos.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO

A otimização do bioprocessamento para a produção de fitase por cultivo submerso utilizando o extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado foi conduzida em duas etapas. Primeiramente, foi conduzida a etapa de otimização de suplementação do meio com variáveis significativas (estudos prévios) ao processo de produção da fitase, utilizando um planejamento experimental do tipo DCCR. Em seguida, foi realizado o estudo de determinação da concentração do extrato de levedura. E por último, a otimização de alguns parâmetros físico-químicos para a produção de fitase, por meio também de um planejamento experimental do tipo DCCR.

3.3.1 Otimização da suplementação do meio para a produção de fitase em cultivo submerso

Após os estudos preliminares de suplementação do meio de fonte de carbono, nitrogênio e minerais, a interação entre alguns fatores foram avaliados por meio da otimização da produção de fitase utilizando um planejamento experimental 2^3 (dois níveis e três variáveis) do tipo DCCR. Esse estudo avaliou as seguintes variáveis independentes: melaço de soja (%), extrato de levedura (%) e CaCl_2 (mM).

Na TABELA 10 encontram-se os resultados do planejamento experimental do tipo DCCR 2³ da otimização da suplementação do meio para a produção de fitase. A produção máxima de fitase foi de 14,5 U mL⁻¹ obtida utilizando 2,43% de melaço de soja, 3,19% de extrato de levedura e 4,05 mM de CaCl₂ (experimento 3). Um resultado similar (experimento 12) de 14,4 U mL⁻¹ de atividade de fitase foi encontrado utilizando 6% de melaço de soja, 4% extrato de levedura e 10 mM de CaCl₂. Outro resultado positivo foi no experimento 4 (2,43% de melaço de soja, 3,19% extrato de levedura e 15,95 mM de CaCl₂) com produção de fitase 14,3 U mL⁻¹. Portanto, analisando as atividades de fitase dos experimentos 3, 4 e 12 verifica-se que são próximas, em condições onde há uma maior concentração de extrato de levedura, que foi a variável que influenciou positivamente nesse estudo, bem como uma relação C/N equilibrada para produção de fitase.

A menor atividade de fitase (7,3 U mL⁻¹) foi obtida no experimento 6 com as variáveis 9,57% melaço de soja, 0,81% extrato de levedura e 15,95 mM de CaCl₂, provavelmente pela baixa concentração de extrato de levedura presente neste experimento e uma relação C/N desequilibrada.

A partir dos dados obtidos foi possível verificar quais variáveis têm influência significativa, em um nível de significância de 5% por meio da análise de variância (ANOVA). A ANOVA do planejamento DCCR da suplementação do meio é apresentada na TABELA 11. O R² (coeficiente de determinação) de 0,84, ou seja, indicou que 84% dos dados obtidos experimentalmente são explicados pelo modelo da EQUAÇÃO 1. A variável significativa ($p < 0,00029$) foi o extrato de levedura. Quanto menor o valor do p , maior a influência desse fator em relação aos demais. O melaço de soja e o CaCl₂ não apresentaram diferença significativa na faixa de concentrações estudadas. As interações entre as variáveis também não foram significativas conforme os dados da ANOVA.

TABELA 10 - RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE (U mL^{-1}) UTILIZANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2³ COM 14 ENSAIOS E 4 PONTOS CENTRAIS

Experimentos	Variáveis independentes			Resposta Atividade de fitase (U mL^{-1})
	Melaço de soja (%)	Extrato de levedura (%)	CaCl_2 (mM)	
1	-1 (2,43)	-1 (0,81)	-1 (4,05)	10,6
2	-1 (2,43)	-1 (0,81)	+1 (15,95)	10,5
3	-1 (2,43)	+1 (3,19)	-1 (4,05)	14,5
4	-1 (2,43)	+1 (3,19)	+1 (15,95)	14,3
5	1 (9,57)	-1 (0,81)	-1 (4,05)	8,7
6	+1 (9,57)	-1 (0,81)	+1 (15,95)	7,3
7	+1 (9,57)	+1 (3,19)	-1 (4,05)	13,2
8	+1 (9,57)	+1 (3,19)	+1 (15,95)	13,4
9	-1,68 (0)	0 (2)	0 (10)	10,7
10	+1,68 (12)	0 (2)	0 (10)	13,0
11	0 (6)	-1,68 (0)	0 (10)	8,7
12	0 (6)	+1,68 (4)	0 (10)	14,4
13	0 (6)	0 (2)	-1,68 (0)	11,5
14	0 (6)	0 (2)	+1,68 (20)	8,8
15 (PC)	0 (6)	0 (2)	0 (10)	11,7
16 (PC)	0 (6)	0 (2)	0 (10)	11,9
17 (PC)	0 (6)	0 (2)	0 (10)	11,0
18 (PC)	0 (6)	0 (2)	0 (10)	11,9

(PC) ponto central

TABELA 11 - ANOVA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2³ PARA AS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA, EXTRATO DE LEVEDURA E CaCl_2

Variáveis	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio	Razão F	Razão p
Melaço de soja (L)	0,8624	1	0,86240	0,5610	0,4752
Melaço de soja (Q)	0,3546	1	0,35466	0,2307	0,6438
Extrato de levedura (L)	56,9414	1	56,9414	37,0429	0,00029
Extrato de levedura (Q)	0,0476	1	0,04765	0,0310	0,8646
CaCl_2 (L)	2,6720	1	2,67204	1,7382	0,2238
CaCl_2 (Q)	2,3780	1	2,37808	1,5470	0,2487
Melaço de soja (L) por extrato de levedura (L)	1,0512	1	1,0512	0,6838	0,4322
Melaço de soja (L) por CaCl_2 (L)	0,1012	1	0,1012	0,0658	0,8039
Extrato de levedura (L) por CaCl_2 (L)	0,2812	1	0,2812	0,1829	0,6801
Erro	12,297	8	1,5371		
Soma dos quadrados totais	77,625	17			

$R^2 = 0,84$ F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrática.

O modelo matemático (Equação 1) gerado para a produção de fitase após a ANOVA apresenta a relação entre as variáveis independentes melaço de soja (A), extrato de levedura (B) e CaCl_2 (C) na produção de fitase (resposta). A atividade de fitase (Y) pode ser prevista pelo modelo matemático a seguir:

$$Y = 11,60 - 0,25A + (0,17)A^2 + 2,04B^* + 0,06B^2 - 0,44C - 0,43C^2 - 0,36AB - 0,11AC + 0,18BC$$

EQUAÇÃO 1

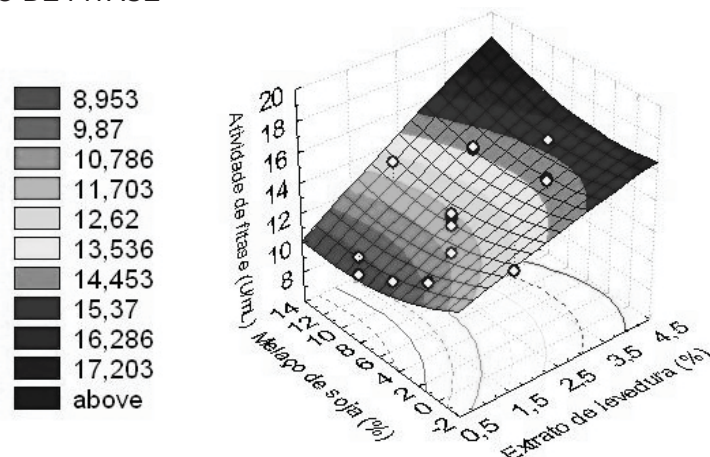
Onde: Y = atividade de fitase, UmL^{-1} ; A = melaço de soja, %; B = extrato de levedura, %; C = CaCl_2 , mM.

(*) efeito significativo ($p < 0,05$)

Em um planejamento experimental tipo DCCR pôde-se gerar um gráfico tridimensional, chamado de superfície de resposta. Na FIGURA 7 é mostrada a superfície gerada para as variáveis independentes melaço de soja e extrato de levedura na produção de fitase como variável resposta. Na FIGURA 8 pode-se observar o ponto de maior produção de fitase é o ponto mais alto da superfície (denominada região ótima). Ou seja, quanto maior a concentração de extrato de levedura, maior será a produção de fitase. Porém o estudo não foi conclusivo, pois não foi observado a região ótima no gráfico e qual a concentração de extrato de levedura poderia haver a melhor influência na produção da fitase (expressa em atividade U mL^{-1}). Por essa razão, a próxima etapa dos estudos foi avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura sob a produção de fitase por cultivo submerso em concentrações acima das estudadas neste DCCR.

Com a otimização do processo de produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 $14,5 \text{ U mL}^{-1}$ houve um aumento de 5,8 vezes em comparação com o controle (extrato aquoso de farelo de trigo tratado a 20%). Relatos da literatura corroboram com o presente estudo, Salmon e colaboradores (2012) otimizaram o bioprocesso de fitase em FES de *S. commune* e obtiveram um aumento de 2,85 vezes em relação ao controle (farelo de trigo tratado). Spier e colaboradores (2011a) aumentaram 4,3 vezes a produção de fitase de *A. niger* FS3 por FES quando comparado ao meio sem otimização.

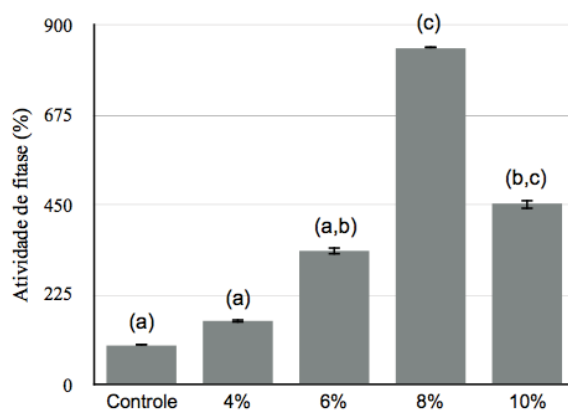
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA APRESENTANDO A REGIÃO ÓTIMA DA INFLUÊNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS MELAÇO DE SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE FITASE



3.3.2 Determinação da melhor concentração de extrato de levedura

Um estudo isolado foi realizado com diferentes concentrações de extrato de levedura em cultivo submerso para avaliar a influência na produção de fitase de *Ganordema* sp. MR-56. A concentração de extrato de levedura 8% (m/v) em cultivo submerso foi a que aumentou em 740% a atividade de fitase em relação ao controle (FIGURA 8).

FIGURA 8 - ESTUDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA NO MEIO DE CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma* sp. MR-56 PARA A PRODUÇÃO DE FITASE. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$) E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)



Conforme a ferramenta estatística *Tukey's multiple comparisons test*, resultou que a concentração de 8% de extrato de levedura apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas às outras concentrações, exceto a 10%. Selvamohan e colaboradores (2012) também

obtiveram resultados positivos com a adição de extrato de levedura no meio fermentativo. Uma concentração de 0,5% (m/v) de extrato de levedura foi possível produzir $0,739 \text{ U mL}^{-1}$ de fitase de *Pseudomonas sp.* em 72 horas de fermentação.

A empresa HIMEDIA LABS que fabrica o extrato de levedura utilizado no presente estudo, contém no produto as composições presentes nas TABELAS 12 e 13. O Extrato de levedura em pó RM027 é preparado por secagem do extrato obtido de células de levedura *Saccharomyces* e rico em vitaminas especialmente aquelas pertencentes ao complexo B e aminoácidos.

Com base nas informações mais detalhadas do extrato de levedura apresentadas nas TABELAS 12 e 13, observou-se que não está presente somente a fonte de nitrogênio, mas também variadas vitaminas e aminoácidos que podem estar relacionadas com o incremento da fitase de *Ganoderma sp.* MR-56 em cultivo submerso. Uma hipótese que a fitase poderia ser ativada por coenzimas. Na literatura foram encontrados relatos de indução de fitase utilizando aminoácidos. Mohamad e colaboradores (2012) isolaram e identificaram uma bactéria *Anoxybacillus rupiensis* termoestável sendo potencial para a produção de fitase e testaram 190 diferentes fontes de energia em FSm. As fontes que foram positivas corroboram com o presente estudo foram a prolina, inositol, ácido glutâmico, isoleucina, leucina, lisina e metionina. Suzuki e colaboradores (2011) destacaram que o uso de vitaminas, como biotina e a riboflavina são essenciais para os micro-organismos, não somente para o crescimento, mas para o desencadeamento de rotas metabólicas. Assim, no presente estudo, as vitaminas e aminoácidos podem estar relacionadas indiretamente com a produção de fitase de *Ganoderma sp.* MR-56.

TABELA 12 - VITAMINAS DO EXTRATO DE LEVEDURA EM PÓ DA MARCA HIMEDIA RM027

Vitaminas	(mcg/g)
Tiamina (B1)	20-70
Riboflavina (B2)	55-100
Piridoxina (B6)	15
Niacina (B3)	250-700
Ácido pantoico (B5)	90
Inositol (B7)	3800
Ácido fólico (B9)	30-40

TABELA 13 - AMINOÁCIDOS PRESENTES NO EXTRATO DE LEVEDURA EM PÓ DA MARCA HIMEDIA RM027

Aminoácidos	% (m/m)
Alanina	5,36
Arginina	3,02
Ácido aspártico	6,69
Cistina	0,74
Ácido glutâmico	19,20
Glicina	3,25
Histidina	1,20
Isoleucina	3,23
Leucina	4,69
Lisina	5,15
Metionina	1,05
Fenilalanina	2,53
Prolina	2,60
Serina	2,84
Threonina	2,95
Triptofano	1,36
Tirosina	1,20
Valina	3,79

3.3.3 Otimização dos parâmetros físico-químicos para a produção de fitase por cultivo submerso

A segunda etapa da otimização de algumas variáveis físico-químicas foi conduzida também com planejamento experimental do tipo DCCR 2³ para as variáveis temperatura de cultivo (°C), pH inicial e taxa de inoculação (%). De acordo com a TABELA 14 o experimento 18 (o ponto central) com pH 6,0, temperatura de 30°C e taxa de inoculação de 3% (v/v) foi o melhor para produção de fitase (12,8 U mL⁻¹). O experimento 14 obteve um resultado similar de 12 U mL⁻¹ com as variáveis pH 6,0, temperatura de 30°C e taxa de inoculação de 5% (v/v). O experimento 8 foi o qual obteve uma menor produção de fitase (2,2 U mL⁻¹) utilizando pH 8,0, temperatura 32,97°C e taxa de inoculação de 4,19% (v/v).

TABELA 14 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2³, APRESENTANDO OS RESULTADOS DOS 18 EXPERIMENTOS QUE ESTUDAM A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES pH, TEMPERATURA DE CULTIVO (°C) E TAXA DE INOCULAÇÃO (%) NA VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE DE FITASE

Experimentos	Variáveis independentes			Resposta Atividade de fitase (U mL ⁻¹)
	pH	Temperatura (°C)	Taxa de inoculação (%)	
1	-1 (4)	-1 (27,05)	-1 (1,81)	6,3
2	-1 (4)	-1 (27,05)	+1 (4,19)	4,6
3	-1 (4)	+1 (32,97)	-1 (1,81)	4,0
4	-1 (4)	+1 (32,97)	+1 (4,19)	7,2
5	+1 (8)	-1 (27,05)	-1 (1,81)	7,3
6	+1 (8)	-1 (27,05)	+1 (4,19)	6,3
7	+1 (8)	+1 (32,97)	-1 (1,81)	3,3
8	+1 (8)	+1 (32,97)	+1 (4,19)	2,2
9	-1,68 (2,63)	0 (30)	0 (3)	7,5
10	+1,68 (9,36)	0 (30)	0 (3)	7,2
11	0 (6)	-1,68 (25)	0 (3)	6,0
12	0 (6)	+1,68 (35)	0 (3)	5,3
13	0 (6)	0 (30)	-1,68 (1)	9,8
14	0 (6)	0 (30)	+1,68 (5)	12,0
15 (PC)	0 (6)	0 (30)	0 (3)	11,3
16 (PC)	0 (6)	0 (30)	0 (3)	11,1
17 (PC)	0 (6)	0 (30)	0 (3)	11,5
18 (PC)	0 (6)	0 (30)	0 (3)	12,8

(PC) Ponto central

A ANOVA é exibida na TABELA 15, com R^2 0,82, o qual sugere que 82% dos valores obtidos de produção de fitase foi atribuído aos níveis das variáveis independentes testadas e 18% da variação não podem ser explicados pelo modelo. A ANOVA mostra que as variáveis significativas em 95% de confiança é a temperatura de cultivo (°C) e pH com interação quadrática. A variável taxa de inoculação (%) não foi significativa na faixa estudada. Este resultado corrobora com o estudo de taxa de inoculação realizado no item 3.2.

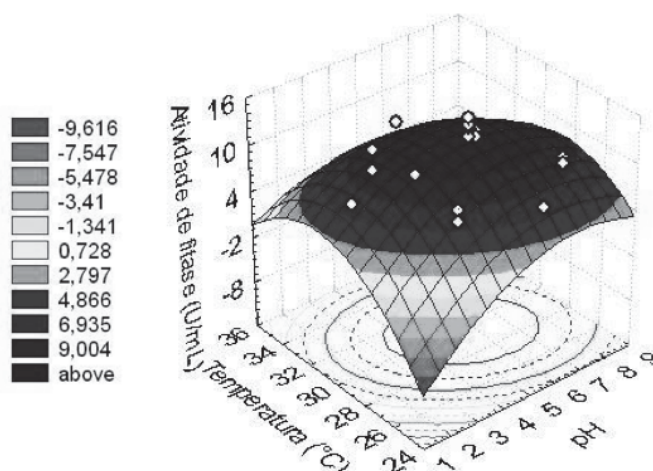
A otimização gerou uma superfície de resposta (FIGURA 9), na qual é possível observar a região ótima onde atingiu uma elevada produção de fitase, alcançando a condição central dos níveis das variáveis independentes testadas. A região que representa maior produção de fitase, região mais escura (preto) inicia em torno de temperatura 30°C e pH em torno de 6,0.

TABELA 15 - ANOVA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR PARA AS VARIÁVEIS TEMPERATURA, pH E TAXA DE INOCULAÇÃO

Variáveis	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Razão F	Razão p
Temperatura (L)	0,8993	1	0,8993	0,2374	0,6391
Temperatura (Q)	55,2674	1	55,2674	14,5897	0,0050
pH (L)	5,9011	1	5,9011	1,5578	0,2472
pH (Q)	91,6203	1	91,6203	24,1864	0,0011
Taxa de inoculação (L)	0,7036	1	0,7036	0,1857	0,6778
Taxa de inoculação (Q)	8,8227	1	8,8227	2,3290	0,1654
Temperatura (L) por pH (L)	8,82	1	8,82	2,3283	0,1655
Temperatura (L) por taxa de inoculação (L)	1,62	1	1,62	0,4276	0,5314
pH (L) por taxa de inoculação (L)	2,88	1	2,88	0,7602	0,4086
Erro	30,3047	8	3,7880		
Soma dos quadrados totais	173,5827	17			

$R^2 = 0,82$ F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrático.

FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA COM A REGIÃO ÓTIMA DE ATIVIDADE DE FITASE COM OS VALORES DA TEMPERATURA E pH



A EQUAÇÃO 2 do modelo matemático gerado para a otimização das variáveis físico-químicas para a produção de fitase apresenta a relação entre a produção de fitase e a temperatura (A), pH (B) e taxa de inoculação (C). A produção de fitase (Y) pode ser predita pelo modelo matemático a seguir:

$$Y = 11,80 - 0,26A - (2,09)A^2 - 0,66B - 22,69B^2 + 0,23C - 0,84C^2 - 1,05AB - 0,45AC - 0,6BC$$

EQUAÇÃO 2

Onde: Y = atividade da fitase, U mL⁻¹; A = temperatura, °C; B = pH; C = taxa de inoculação, %.

(*) efeito significativo ($p < 0,05$)

As variáveis físico-químicas estabelecidas nessa otimização foram a temperatura 30°C e pH 6,0, correspondendo à máxima produção de fitase (12,8 U mL⁻¹) os quais foram fixados para estudos posteriores. Embora a variável taxa de inoculação não foi significativa nesse estudo, mas foi fixada em 3% (v/v) para estudos posteriores.

Vats e Banerjee (2002) estudaram alguns fatores que influenciaram o crescimento e a produção da fitase de *A. niger* em FSm. A condição foi de temperatura de crescimento de 30°C e observou-se que em temperatura de 45°C não houve crescimento do micro-organismo. Tahir e colaboradores (2010) verificaram que a melhor temperatura de FSm para síntese de fitase de *A. niger* foi de 30°C, a qual corrobora com o presente estudo. Do mesmo modo Spier e colaboradores (2008) obtiveram produção máxima de fitase de *A. niger* FS3 à 30°C, porém em FES.

3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DO FARELO DE TRIGO

Na TABELA 16 apresenta-se os resultados obtidos da análise físico-química das amostras: extrato de farelo de trigo 20% (m/v) e extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado e otimizado desse estudo. A umidade das amostras analisadas resultaram em um menor valor de 87,65% no extrato de farelo de trigo tratado e o otimizado, e uma maior umidade no farelo de trigo sem otimizar de 95,20%. Sugere-se que essa diferença é devido à adição de 8% (m/v) de extrato de levedura no meio otimizado. O teor de proteínas indicou maior valor de 1,21% no meio otimizado do mesmo modo pela adição da fonte de nitrogênio. Foi observado um aumento no resíduo mineral no extrato de farelo de trigo tratado e otimizado. Os açúcares totais das duas amostras não houveram alterações relevantes, bem como o pH e os lipídios.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FARELO DE TRIGO

Parâmetros	Extrato de farelo de trigo 20%	Extrato de farelo de trigo 20%
		tratado otimizado
Umidade (%)	95,20	87,65
Proteínas (% /mL)	0,18	1,21
Lipídios (%)	1,07	1,20
Resíduo mineral (%)	0,44	1,65
pH	6,02	5,95

4 CONCLUSÃO

Os estudos de suplementação do meio e as etapas de otimização proporcionaram um aumento significativo na produção da fitase por *Ganoderma* sp. MR-56 em cultivo submerso. Portanto, a adição de extrato de levedura 8% (m/v) no meio de cultivo foi positiva, bem como a temperatura de cultivo 30°C e pH inicial de 6,0 testados favoreceram o aumento da síntese da enzima.

CAPÍTULO IV ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREADORES

RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo a avaliação da produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 em diferentes modelos de biorreatores utilizando o cultivo submerso em condições otimizadas: em frascos de Erlenmeyer com agitação orbital e aeração por difusão; dois tipos de cultivo com aeração forçada: frascos tipo Dreschel e biorreator de tanque agitado (STR). Em frascos de Erlenmeyer a produção enzimática, com agitação de 120 rpm, alcançou $11,1 \text{ U mL}^{-1}$ de enzima e produtividade de fitase de $0,12 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 96 horas de cultivo. Em frascos tipo Dreschel com injeção de ar foram avaliados a influência de diferentes taxas de aeração (0,8, 1,2, 1,6 e 2,0 vvm) na produção da enzima durante o cultivo submerso. A maior produção de fitase foi de $20,94 \text{ U mL}^{-1}$ e produtividade de $0,08 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, porém em 264 horas de cultivo com taxa de aeração de 2 vvm. A síntese de fitase em frascos Dreschel com aeração forçada mostrou 1,88 vezes em relação à produção conduzida em frascos de Erlenmeyer. Em STR a produção máxima de fitase foi de $10,3 \text{ U mL}^{-1}$ e produtividade de fitase $0,14 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 72 horas de cultivo.

Palavras-chave: fitase, *Ganoderma* sp. MR-56, Erlenmeyer, frasco do tipo Dreschel, biorreator do tipo STR.

1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, dentre estas destacam-se as fitases, especialmente com aplicação em indústrias de alimentos, para o consumo humano e animal (SALMON et al., 2012; GREINER e KONIETZNY, 2006).

Estudos apresentados na literatura referem-se à maior produção de fitases em FES, porém em FSm existe maior facilidade de escalonamento e controle de parâmetros comparado com a FES (SALMON et al., 2012; SOCCOL et al., 2014). Shivanna e Venkateswaran (2014) produziram fitases por FSm e FES de *A. niger* CFR 335 e *A. ficuum* SGA 01. Na FES utilizaram farelo de trigo como substrato e produziram 60,6 U g⁻¹ e 38 U g⁻¹ de enzima de *A. niger* CFR 335 e *A. ficuum* SGA 01, respectivamente, em 120 horas de processo. Em FSm usando caldo batata-dextrose, a máxima produção foi de 9,6 e 8,2 U mL⁻¹ de atividade de enzima foi obtida por *A. niger* CFR 335 e *A. ficuum*, respectivamente. Badamchi e colaboradores (2013) primeiramente otimizaram a produção de fitase de *A. ficuum* em frascos de Erlenmeyer em meio de cultivo contendo farelo de trigo e alcançaram uma produção de 40,21 U mL⁻¹ de atividade de fitase. Em biorreator tipo STR de 3 L com as mesmas condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer, produziram o dobro de atividade de fitase (87,75 U mL⁻¹).

Em escalas industriais para produção de fitases são comumente utilizadas FSm em reatores com agitação mecânica (SALMON et al., 2012; POLIDORO, 2009). Embora os biorreatores STR não são perfeitamente adequados para cultivo de fungos filamentosos, pois o grau de agitação e aeração requeridos para atingir a transferência de massa adequada, em muitos casos, pode causar danos às células dos micro-organismos devido à alta tensão cisalhamento dos impelidores (FONTANA, 2009; ROYSE, 1987; CHISTI e JAUREGUI-HAZA, 2002). Em cultivos fúngicos, o crescimento de biomassa bem como a formação de *pellets* exigem uma maior transferência de oxigênio. Essa transferência é uma função complexa, relacionada com parâmetros operacionais, incluindo agitação, taxa de aeração e dimensões geométricas do biorreator (JU et al., 1991; FONTANA, 2009).

A aeração e agitação são parâmetros de grande importância durante as FSm fúngicas. A aeração tem como objetivo principal de suprir as suas necessidades de oxigênio para o crescimento do micro-organismo. A aeração pode ser melhorada por agitação, resultando num aumento da interface entre o gás e o líquido. Um efeito positivo da agitação é diminuir o tamanho dos agregados miceliais, tornando o oxigênio mais assimilável entre as células (JAFARI et al., 2007; BAKRI et al., 2011).

O frasco tipo Dreschel é um biorreator que permite a transferência de gases por meio de injeção de ar com o auxílio de uma bomba. A diferença é que o ar é inserido em um tubo concêntrico vertical acoplado na parte superior do frasco até a sua extremidade com a finalidade de dispersão das bolhas de ar na parte inferior do frasco. Esta técnica permite uma superfície de contato maior do gás com o líquido, de modo que o gás se rompe em bolhas menores de ar. Em vista dessa importância em reatores, o ar proporciona um contato com o meio líquido para que ocorram os processos de transferência dos componentes gasosos e de massa (GOLDSTEIN, 2013). As vantagens em utilizar biorreatores com injeção de ar como o Dreschel é o baixo consumo de energia e uma menor tensão de cisalhamento das células microbianas (FONTANA, 2009; VIAL et al., 2002).

As produções de fitases provenientes de fungos têm sido estudadas por muitos pesquisadores. No entanto, existe poucas pesquisas sobre a avaliação da síntese de fitase provenientes de macromicetos relacionando parâmetros de cultivo em diferentes modelos de biorreatores.

Neste capítulo foi avaliado a produção da fitase em diferentes tipos de biorreatores: frascos agitados tipo Erlenmeyer com aeração por difusão, frascos tipo Dreschel com aeração forçada e STR. Na literatura não há relatos de trabalhos da utilização de frascos tipo Dreschel com injeção de ar com macromicetos para a produção de fitases.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado no presente trabalho foi o *Ganoderma sp.* MR-56, conforme descrito no subitem 2.1 do capítulo III.

2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO SUBMERSO

O preparo do substrato para cultivo submerso foi conduzido conforme descrito no subitem 2.2 do capítulo III.

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA CULTIVO SUBMERSO

O pré-tratamento do extrato de farelo de trigo foi conduzido conforme descrito no subitem 2.3 do capítulo III.

2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

O preparo do pré-inóculo foi conduzido conforme descrito no subitem 2.4 do capítulo III.

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FITASE

A determinação da atividade fitásica foi realizada conforme descrito no subitem 2.6 do capítulo III.

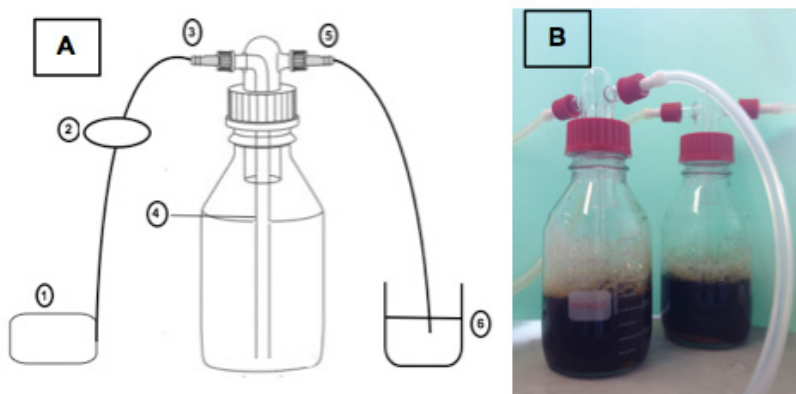
2.6 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Inicialmente foi realizado o estudo da cinética de produção da enzima fitase em meio extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado sem otimização durante o cultivo submerso e posteriormente com o meio otimizado. As condições otimizadas de fermentação utilizadas foram: extrato de farelo de trigo 20% (m/v) tratado, extrato de levedura 8% (m/v), pH inicial de 6,0, temperatura de cultivo de 30°C e agitação orbital em *shaker* (Tecnal, TE-420) a 120 rpm. A finalidade deste estudo foi avaliar a produção da fitase em cultivo submerso por *Ganoderma* sp. MR-56 em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL meio durante 192 horas com a composição do meio de cultivo otimizado. As fermentações foram realizadas com taxa de inoculação de 3% (v/v). Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de atividade enzimática (U mL^{-1}), concentração de biomassa seca (g L^{-1}), pH, determinação do ácido fítico (dg mL^{-1}) e de açúcares redutores (g L^{-1}).

2.7 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA

Os experimentos para produção de fitase por cultivo submerso com aeração forçada foram conduzidos em frascos de lavagem de gases cilíndricos tipo Dreschel de capacidade total de 500 mL (LABORGLAS, Brasil) de vidro de borosilicato, diâmetro de 8 cm e altura de 15 cm. A parte superior (tampa) possui duas conexões de vidro: uma para entrada de ar esterilizado com o auxílio de um microfiltro de ar 0,22 μm (Sartorius, Alemanha) e outra para saída de ar (FIGURA 10 A). Os frascos continham 200 mL de extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado e otimizado, taxa de inoculação 3% (v/v), pH 6,0 e temperatura 30°C. Utilizou-se diferentes taxas de aeração que permaneceram constantes ao longo do cultivo: 0,8, 1,0, 1,2, 1,6 e 2,0 vvm para avaliar a influência da aeração na produção enzimática. O fluxo de ar foi medido com auxílio de um rotâmetro. Os cultivos foram realizados em duplicata, as amostras foram coletadas a cada 24 horas de intervalo entre 0 a 384 horas de cultivo para análises de atividade de fitase expressa em U mL^{-1} em triplicata.

FIGURA 10 – A: FRASCO TIPO DRESCHER COM INJEÇÃO DE AR PARA PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO. PARTES DO FRASCO: 1- BOMBA DE AR; 2- FILTRO DE AR 0,22 μm ; 3- ENTRADA DE AR; 4- CILINDRO VERTICAL; 5- SAÍDA DE AR; 6- BÉQUER COM HIPOCLORITO DE SÓDIO 1% B: SISTEMA DE BIORREATORES TIPO DRESCHER COM INJEÇÃO DE AR PARA PRODUÇÃO DE FITASE



Fonte: A: <http://www.directindustry.com>, modificado. B: A autora (2015).

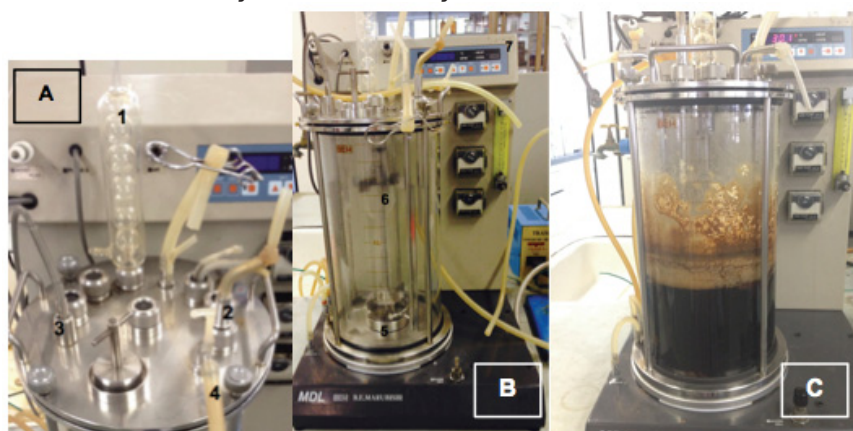
2.8 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO

A produção de fitase por cultivo submerso de *Ganoderma* sp. MR-56 foi

realizada em biorreator tipo STR com capacidade total de 7 L contendo 4 L de meio de cultivo otimizado. Iniciou-se com a transferência das condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL para o biorreator STR. O biorreator modelo MDL da marca B.E. MARUBISHI (Japão) consiste em um cilindro vertical de vidro borosilicato e tampa de aço inoxidável, com 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura (FIGURA 11 A e B). A agitação foi realizada por meio de pás internas tipo planas verticais (impelidores). A aeração (1 vvm) ocorreu com emprego de um compressor de ar cuja entrada de ar no biorreator localiza-se na parte superior com o auxílio de um microfiltro de 0,22 μm . O fluxo de ar foi medido com auxílio de um rotômetro.

As condições de cultivo utilizadas foram: 4 litros de meio de cultivo otimizado (extrato de farelo de trigo 20% m/v tratado e extrato de levedura 8% m/v) com as condições físico-químicas de pH 6,0, temperatura de cultivo 30°C e taxa de aeração de 1,0 vvm. A taxa de inoculação para 6% (v/v) foi alterada devido às condições de esterilidade do meio de cultivo, bem como a agitação de 200 rpm para proporcionar uma maior homogeneidade do meio. Amostras foram retiradas a cada 24 horas de intervalo entre 0 a 192 horas de cultivo para análise de fitase (U mL^{-1}), determinação de biomassa seca (g L^{-1}), concentração de açúcares redutores (g L^{-1}), determinação do ácido fítico (mg mL^{-1}) e pH.

FIGURA 11 – BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO (STR) UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO. A: 1- CONDENSADOR DE AR; 2- ALIMENTAÇÃO DO INÓCULO; 3- Sonda de pH; B: 4- SAÍDA PARA AMOSTRA ; 5- DISPERSOR DE AR; 6- IMPELIDORES; 7- PAINEL DE CONTROLE DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO; C: PRODUÇÃO DE FITASE EM STR.



Fonte: A autora (2015).

2.9 ANÁLISES

A determinação da atividade de fitase nas amostras foi realizada pela análise espectrofotométrica a 355 nm de Heinonen e Lahti (1981) modificado. A determinação de biomassa seca nas amostras foi conduzida pelo método termogravimétrico, no qual o material foi seco em estufa à 80°C até a massa constante (AOAC, 1995). As análises de pH foram feitas pelo método potenciométrico com auxílio do pHmetro de bancada (TECNOPON mPA 210, Brasil). As análises de açúcares redutores foram realizadas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959) expressos em glicose g L⁻¹. As determinações do ácido fítico foram realizadas por método espectrofotométrico à 500 nm (LATTA e ESKIN, 1980).

2.10 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO

A determinação de alguns parâmetros cinéticos foi realizada a partir dos dados obtidos em frascos de Erlenmeyer e STR. Para a formação de biomassa foi calculada a velocidade específica de crescimento do micro-organismo e definida conforme a equação 3:

$$\mu = \frac{dX}{dt} / X \text{ (Eq. 3)}$$

O rendimento da biomassa/substrato ($Y_{X/S}$), rendimento da formação do produto/substrato consumido ($Y_{P/S}$), rendimento da formação do produto/formação de biomassa ($Y_{P/X}$) e produtividade foram calculados pelas equações 4, 5, 6 e 7:

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \text{ (Eq. 4)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t} \text{ (Eq. 5)}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_t - P_0}{X_t - X_0} \text{ (Eq. 6)}$$

$$P = \frac{P_t - P_0}{t_t} \text{ (Eq. 7)}$$

Onde:

X_t = concentração de biomassa seca (g L⁻¹); X_0 = concentração inicial de biomassa seca (g L⁻¹); S_t = concentração de substrato (dg mL⁻¹); S_0 = concentração inicial de substrato (dg mL⁻¹); P_t = produto formado (U mL⁻¹); P_0 = produto inicial formado (U mL⁻¹); t_t = tempo do produto formado (h).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE FITASE EM CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

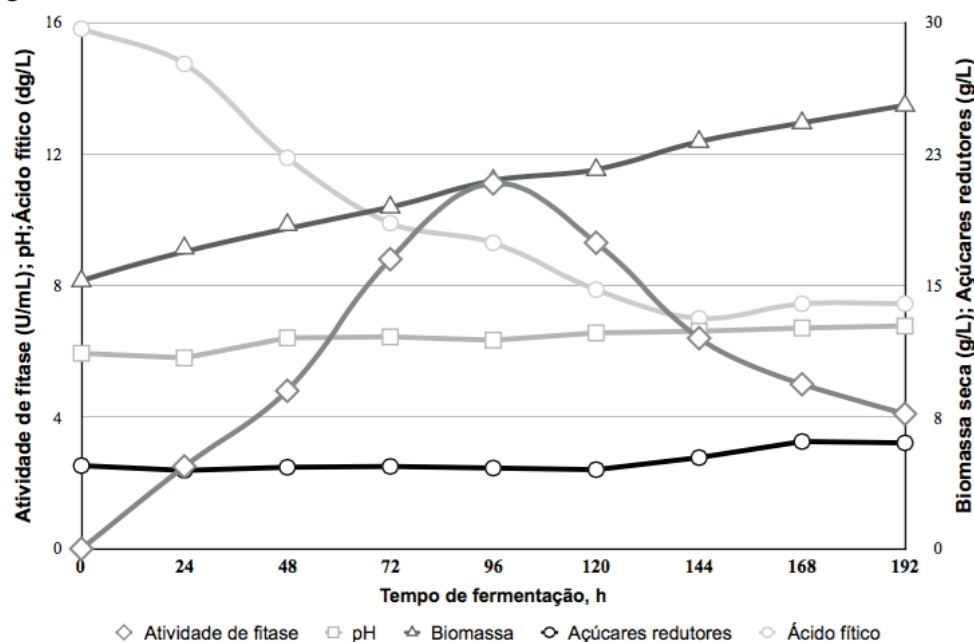
Primeiramente a cinética realizada no meio sem otimização, a síntese de fitase em 120 horas em cultivo submerso alcançou atividade máxima de $2,5 \text{ U mL}^{-1}$. Após 144 horas, a produção de fitase diminuiu para $1,7 \text{ U mL}^{-1}$. De acordo com Shimizu (1993) a produção máxima de fitase de *A. oryzae* K1 foi de $0,4 \text{ U mL}^{-1}$ em 120 horas de fermentação corroborando com o presente estudo. Estudos com *S. thermophile* também condescendem em 120 horas de fermentação com o pico máximo de produção de fitase (SINGH e SATYANARAYANA, 2012).

Para as condições otimizadas, a atividade máxima de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 foi de $11,1 \text{ U mL}^{-1}$ alcançada em 96 horas de cultivo (conforme estudo apresentado no Capítulo III). A FIGURA 12 apresenta os resultados da cinética da produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso em frascos de Erlenmeyer (condições otimizadas) com agitação orbital e com aeração por difusão. A maior produtividade ($0,12 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi alcançada em 72 e 96 horas de cultivo, a qual está correlacionada com a máxima produção de fitase ($11,1 \text{ U mL}^{-1}$). O crescimento da biomassa microbiana mostrou um crescimento linear ao longo do cultivo. Os valores de pH das amostras tiveram uma variação entre 5,8 até 7,96 ao longo do cultivo. O consumo de açúcares redutores durante o cultivo submerso não está correlacionado com o crescimento da biomassa de *Ganoderma* sp. MR-56.

O basidiomiceto *Ganoderma* sp. MR-56 teve a capacidade de degradar o ácido fítico presente no extrato de farelo de trigo durante o cultivo submerso. A degradação máxima do ácido fítico foi de 59,2% ao longo do cultivo submerso. Nos estudos de El-Batal e Abdel Karem (2001) um consumo semelhante de fitato (50,3%) foi descrito, porém a produção da enzima fitase foi conduzida no processo de FES ($2,5 \text{ U g}^{-1}$) por *A. niger* A-98 em 120 horas, com os seguintes parâmetros: 60% de umidade, 6% de glicose, 0,5 mg de fosfato e 0,3% (m/v) de surfactante Tween 80. Em estudo similar de Gunashree e Venkateswaran (2008) obtiveram $12,6 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade de

fitase de *A. niger* CFR 335 em FSm, mas em 120 horas de fermentação. Os dados de Spier e colaboradores (2011a) condescendem com os dados encontrados no presente estudo. A atividade máxima de fitase ($51,53 \text{ U g}^{-1}$) de *A. niger* FS3 também foi alcançada em 96 horas, porém os autores utilizaram o processo de FES.

FIGURA 12 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma* sp. MR-56 EM FRASCOS DE ERLENMEYER. PARÂMETROS AVALIADOS: ATIVIDADE DE FITASE, AÇÚCARES REDUTORES, BIOMASSA SECA, pH E ÁCIDO FÍTICO



Os resultados de produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresentados corroboram com os de Singh e Satyanarayana (2006) com uma produção similar de $12,6 \text{ U mL}^{-1}$ em FSm de *S. thermophile*, mas em 72 horas de fermentação. Por outro lado, segundo os mesmos autores, em outro trabalho (2008) a produção máxima de fitase ($9,9 \text{ U mL}^{-1}$) realizada em frascos de Erlenmeyer foi em 96 horas de FSm.

Surya e colaboradores (2013) também encontraram uma produção máxima de fitase ($15,4 \text{ U g}^{-1}$) obtida em 96 horas de fermentação. Mittal e colaboradores (2012) produziram fitase de *Klebsiella* sp. DB-3 FJ711774.1 em FSm utilizando a casca de laranja e suplementado com 0,2% de sacarose, 0,1% de fosfato de amônio e taxa de inoculação de 1,5%. A produção de fitase alcançou $3,15 \text{ U mL}^{-1}$ em 72 horas de fermentação. Nesse mesmo estudo foi usado o farelo de trigo como substrato da FSm que produziu $2,41 \text{ U mL}^{-1}$ com as mesmas condições citadas anteriormente.

Dados da literatura sobre o crescimento microbiano de *Ganoderma* sp., Cui e Zhang (2011) que avaliaram a influência do zinco, selênio e ferro na produção de polissacarídeos e na biomassa microbiana de *Ganoderma lucidum* em frascos de Erlenmeyer. A fase de adaptação do micro-organismo ocorreu durante 24 horas de cultivo (em torno de $2,7 \text{ g L}^{-1}$) e a fase exponencial ocorreu durante 36 a 120 horas de cultivo com produção máxima de biomassa de 14 g L^{-1} . Após, observou-se um declínio na produção de biomassa (12 g L^{-1}) de *Ganoderma lucidum* (CUI e ZHANG, 2011). Zhang e colaboradores (2011) produziram biomassa e ácido ganodérico de *Ganoderma applanatum* em frascos de Erlenmeyer em cultivo submerso. A fase de adaptação do micro-organismo ocorreu em 24 h com produção de 5 g L^{-1} de biomassa seca e a fase exponencial foi de 24 a 96 horas de cultivo com formação de 28 g L^{-1} de biomassa seca. A fase estacionária ocorreu em 120 horas de cultivo e em seguida da fase de declínio 168 h com produção de aproximadamente 23 g L^{-1} de biomassa.

3.2 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA

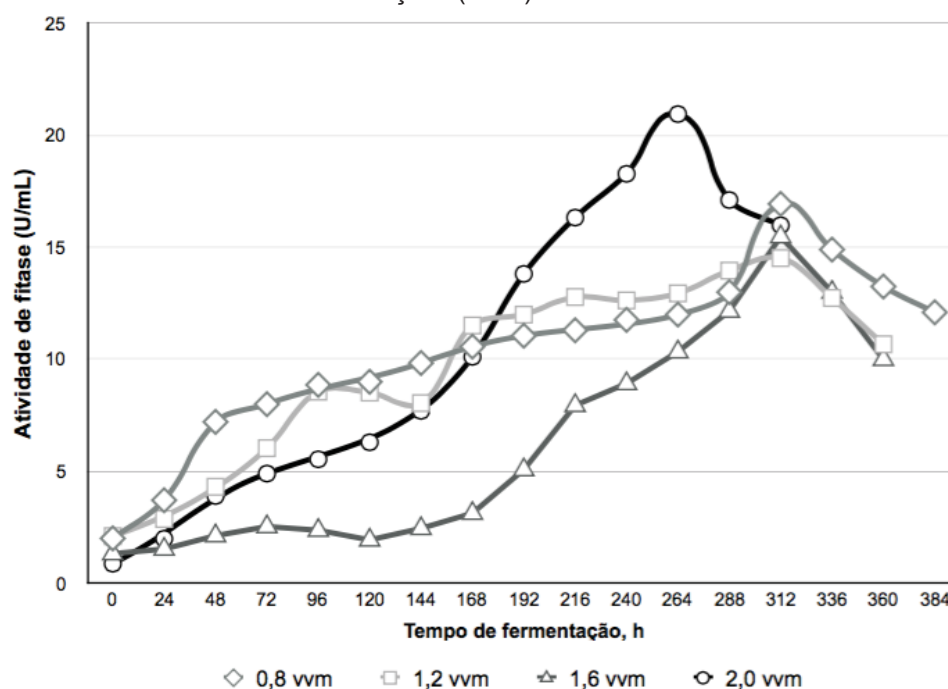
Em frascos tipo Dreschel foram avaliados a influência de diferentes níveis de aeração (0,8, 1,0, 1,2, 1,6 e 2,0 vvm) na produção da fitase durante o cultivo em meio otimizado (FIGURA 10 B). Os resultados estão apresentados na FIGURA 13.

A produção máxima de fitase foi de $20,94 \text{ U mL}^{-1}$ com taxa de aeração de 2,0 vvm em 264 horas de cultivo. Entretanto, as taxas de aeração 0,8, 1,2 e 1,6 vvm também influenciaram na produção da fitase em 16,93, 14,52, 15,47 U mL^{-1} de atividade enzimática, respectivamente, todas em 312 horas de cultivo. A maior produtividade ($0,08 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi alcançada em 264 horas de cultivo e taxa de aeração de 2,0 vvm. Em 312 horas de cultivo as taxas de aeração 0,8, 1,2 e 1,6 vvm alcançaram a mesma produtividade de $0,05 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Como já observado durante o cultivo submerso, a maior taxa de aeração favoreceu a produção de fitase. Portanto, usando-se a taxa de aeração 2 vvm ocorreu a produção de fitase em 264 horas de cultivo do que em 312 horas de fermentação. A aeração em cultivos é necessário para o crescimento

microbiano, bem como para produção de compostos bioativos. A aeração também pode ser melhorada por agitação que promove a dispersão de O_2 , mediante ao aumento da área interfacial entre o gás e o líquido. Sabe-se que a agitação do meio líquido submete as bolhas de ar a desintegrar-se em uma quantidade elevada de pequenas bolhas. Portanto, torna mais fácil o acesso do oxigênio para as células microbianas (BAKRI et al, 2011; JAFARI et al., 2007).

Comparando o biorreator tipo Dreschel com os frascos de Erlenmeyer, a maior produção encontrada foi de $20,94 \text{ U mL}^{-1}$ em frascos tipo Dreschel com aeração forçada, porém com produtividade menor de $0,08 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e o tempo de cultivo mais longo (264 horas). Avaliando as produções de fitases nos frascos de Erlenmeyer (aeração por difusão) ($11,1 \text{ U mL}^{-1}$ em 96 horas de cultivo) com o frasco com aeração forçada 2 vvm observa-se um aumento de 1,88 vezes na produção da enzima.

FIGURA 13 - PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS TIPO DRESCHER COM AERAÇÃO FORÇADA UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (VVM)



Na literatura não há relatos sobre cultivo de macromicetos para produção de fitases em frascos tipo Dreschel com aeração forçada. Não obstante, foram encontrados outros trabalhos com este tipo de frasco para outras finalidades. Como por exemplo, Lascelles (1960) que produziu as

enzimas δ -amino-levulínico-ácido sintetase e δ -amino-levulínico-ácido desidratase de *Rhodopseudomonas spheroides* em frascos tipo Dreschel em anaerobiose com injeção de 5% (v/v) de CO₂, e N₂. De outra forma, Fogg e Collyer (1953) utilizaram os frascos tipo Dreschel para o cultivo de algas *Chlorella vulgaris*, *Tribonema aequale*, *Monodus subterraneus*, *Anabaena cylindrica* e *Oscillatoria* sp. para o bioacúmulo de lipídios. A taxa de aeração de ar era 10 L h⁻¹ para cada cultura e 0,5% de CO₂.

Por outro lado, o presente trabalho se contrapõe ao estudo de Maller e colaboradores (2014) que produziram o dobro de fitase (41 U mL⁻¹) em reator do tipo *air-lift* em 144 horas de fermentação e taxa de aeração de 1 vvm. Similarmente Singh e Satyanarayana (2008) produziram em torno de 11,5 U mL⁻¹ de atividade de fitase de *S. thermophile* porém em 48 horas de fermentação em biorreator *air-lift* de capacidade de 22 L, 10 L de meio e taxa de aeração de 2 vvm.

Siegel e Robinson (1992) e Pedroso (2003) relataram que em alguns processos biológicos, tais como o presente trabalho, a vantagem do biorreator com aeração forçada sobre os STR pode estar relacionada com o fato de a força de cisalhamento imposta pelo campo turbulento nas células ou *pellets* suspensos no meio ser muito menor em biorreatores com injeção de ar. Um aspecto bastante importante é que o campo de cisalhamento é mais homogêneo nos biorreatores com aeração forçada, sendo relativamente constante.

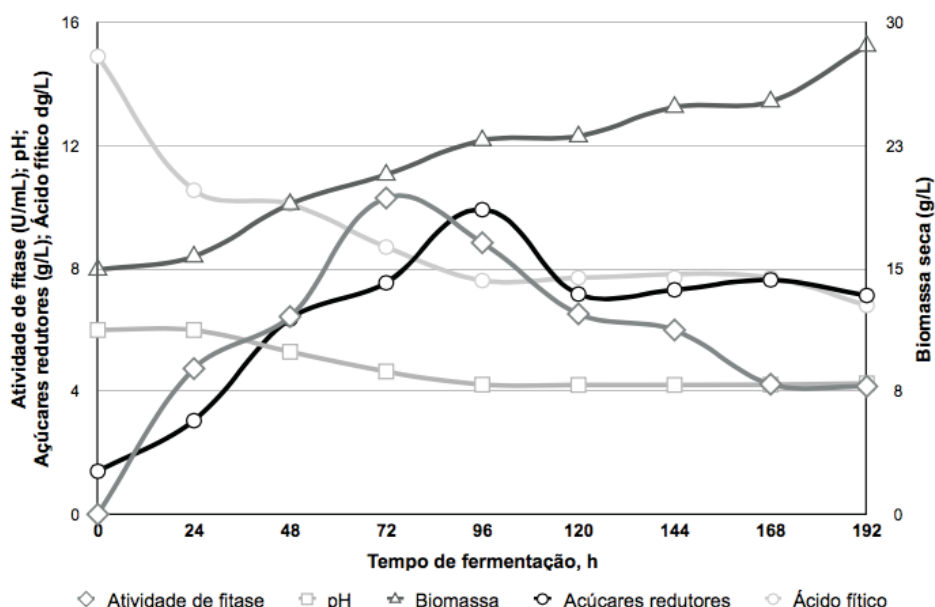
3.3 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO

Para a produção de fitase em STR foram utilizadas as condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer. A condição físico-químicas para a produção da enzima foi de agitação 200 rpm, taxa de aeração de 1,0 vvm e temperatura de cultivo de 30°C (FIGURA 11 C). A taxa de inoculação para 6% (v/v) foi alterada devido às condições de esterilidade do meio de cultivo, bem como a agitação de 200 rpm para proporcionar uma maior homogeneidade do meio. Os resultados de produção de fitase em STR estão apresentados na FIGURA 14. A síntese de fitase proveniente do macromiceto *Ganoderma* sp.

MR-56 iniciou-se no período entre 0 a 48 horas. A máxima produção atingida foi de $10,3 \text{ U mL}^{-1}$ em 72 horas de cultivo e produtividade de $0,14 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Após 96 horas, a concentração de fitase foi diminuindo ao longo do tempo para $6,5 \text{ U mL}^{-1}$ e $4,2 \text{ U mL}^{-1}$ em 120 e 192 horas de cultivo, respectivamente.

O crescimento de biomassa microbiana demonstrou um crescimento linear ao longo do cultivo. O consumo do fitato ao longo do cultivo foi em torno de 54%. O pH durante o processo variou de 6,0 a 4,21. Sugere-se que o oxigênio dissolvido no meio de cultivo pode acidificar o meio, bem como a composição química a cada instante do processo, visto que o micro-organismo consome nutrientes, ao longo do tempo, lançando no meio produtos do metabolismo. Uma hipótese é a formação do ácido fosfórico, produto da reação da hidrólise do fitato, acidificando o meio. Outra hipótese é a excreção de gás carbônico no meio ou a excreção de íons H^+ durante a geração de ATP pela respiração celular (SCHIMIDELL, 2001; DE MORAIS, 1984).

FIGURA 14 - PERFIL DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 POR CULTIVO SUBMERSO EM STR (ATIVIDADE DE FITASE, pH, BIOMASSA SECA, AÇÚCARES REDUTORES E ÁCIDO FÍTICO)



Uma produção similar foi encontrada nos estudos de Verma e Satyanarayana (2012) que produziram fitase de *Pichia anomala* em FSm utilizando um tanque agitado de capacidade total de 7 L contendo 4 L de meio de melaço de cana. Em 20 horas de fermentação, a levedura produziu $11,5 \text{ U mL}^{-1}$ e $13,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca. Georgiev e colaboradores (2013)

estudaram a fitase intracelular de *Candida melibiosica* 2491 ao longo da FSm em um biorreator de 2 L utilizando 1 L de meio de cultivo. O pH inicial foi de 8,5 em 12 horas o pH foi de 7,5 e no final do processo foi 8,0. Rani e colaboradores (2013) produziram fitase de *Rhizopus oryzae* em um fermentador de capacidade de 7 L e contendo 5 L de meio de cultivo. A máxima produção foi de aproximadamente 13 U mL^{-1} em 96 horas de fermentação e produtividade de $0,136 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, os quais mostram resultados similares com o presente estudo.

Contrapondo o presente estudo, a produção de fitase de *A. ficuum* conduzido em STR tipo *bench-top*, apresentou uma produção menor de $3,84 \text{ U mL}^{-1}$ em 96 horas de fermentação (COBAN e DEMIRCI, 2014b). Em contrapartida, apesar de Shah e colaboradores (2009) produzirem 80 U mL^{-1} de fitase de uma cepa mutante de *A. niger* NCIM 563, o pico de atividade enzimática foi ocorrer somente em 192 horas de fermentação. A enzima foi produzida em STR de 14 L e o meio era composto de 1% de farelo de arroz, 3,5% de glicose com parâmetros de 0,2 vvm de taxa de aeração e 550 rpm de agitação.

Com relação à influência da agitação e aeração na produção de fitases de *Enterobacter sakazakii* ASUIA279, Hussin e colaboradores (2012) evidenciaram que estes dois fatores foram significativos para a produção da enzima em STR de capacidade de 2 L contendo 1 L de meio otimizado. Porém não corroboram com o presente estudo, apresentando diferentes condições de temperatura de incubação de $39,7^{\circ}\text{C}$, pH de 7,1, 13,6% de farelo de arroz, 320 rpm de agitação e sem aeração. Badamchi e colaboradores (2013) resultaram em produtividade de fitase de $1,18 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de *A. ficuum* PTCC em biorreator de capacidade total de 3 L com 1 L e meio de cultivo, em utilizando condições de 2 vvm de taxa de aeração, 180 rpm de agitação, temperatura de fermentação 30°C e 72 horas de fermentação.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO

Os parâmetros cinéticos de rendimentos, velocidade específica de crescimento do micro-organismo (μ) e produtividade obtidos ao longo do cultivo em frascos de Erlenmeyer e STR são apresentados na TABELA 17 e 18, respectivamente. Analisando os dados obtidos durante o cultivo submerso

em frascos de Erlenmeyer, constatou-se que a maior velocidade específica de crescimento foi de $0,0053 \text{ h}^{-1}$ em 48h e a maior produtividade alcançada foi de $0,13 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 72 h. O rendimento $Y_{P/S}$ mostrou um pico em 96 h. Sugere-se que em cada miligrama de substrato consumido foi gerado 15,53 U em 96 h de cultivo. Por outro lado, o rendimento $Y_{X/S}$ foi máximo em 168 h com 9,92 g de biomassa formada para cada miligrama de substrato consumido. Observou-se que o rendimento do produto ($Y_{P/X}$) teve um leve aumento de 1,73 para $1,86 \text{ U g}^{-1}$ (24 - 72 h).

Em STR o valor máximo para μ foi $0,0071 \text{ h}^{-1}$ em 48 h de cultivo e produtividade de $0,14 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 72 h. A conversão de consumo de substrato em formação de biomassa apresentou um bom rendimento ($Y_{X/S} = 13,94$) em 144 horas de cultivo. O maior rendimento $Y_{P/S}$ de substrato em produto resultou em 13,37 U de fitase para cada miligrama de substrato consumido em 72 h do processo. A razão da produção de fitase e biomassa formada ($Y_{P/X}$) foi máxima (1,43) em 72 horas de cultivo.

TABELA 17 - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO OBTIDOS EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Tempo de cultivo (h)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Produtividade ($\text{U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
24	0,81	1,40	1,73	0,0022	0,10
48	0,82	0,97	1,19	0,0053	0,10
72	0,71	1,32	1,86	0,0021	0,13
96	0,88	1,55	1,77	0,0030	0,12
120	0,80	1,05	1,31	0,0012	0,07
144	0,90	0,62	0,68	0,0029	0,04
168	1,07	0,48	0,44	0,0018	0,03

TABELA 18 - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO OBTIDOS EM STR

Tempo de cultivo (h)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Produtividade ($\text{U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
24	0,44	0,62	1,42	0,0021	-
48	0,84	0,97	1,10	0,0071	0,13
72	0,94	1,32	1,43	0,0036	0,14
96	1,08	1,55	0,86	0,0038	0,09
120	1,13	1,05	0,55	0,0004	0,05
144	1,38	0,61	0,40	0,0030	0,04
168	1,29	0,47	0,21	0,0006	0,02

4 CONCLUSÃO

O uso de diferentes tipos de biorreatores para produção de fitases de

Ganoderma sp. MR-56 em cultivo submerso foi realizado. De modo geral, os resultados desse trabalho indicaram que o biorreator tipo Dreschel com aeração forçada (2 vvm) proporcionou maior produção de fitases ($20,94 \text{ U mL}^{-1}$) de *Ganoderma* sp. MR-56 porém com menor produtividade ($0,08 \text{ U mL}^{-1}\text{h}^{-1}$), visto que alcançou produção mais expressiva quando comparado com frascos de Erlenmeyer. Em STR a produção de fitase foi satisfatória ($10,3 \text{ U mL}^{-1}$) e maior produtividade de $0,14 \text{ U mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 72 horas de cultivo.

CAPÍTULO V SEPARAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56

RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo a separação, recuperação e caracterização da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 produzida por cultivo submerso. Os métodos de purificação foram considerados de baixa resolução e alta resolução. Primeiramente, dentre os testes de baixa resolução, a precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação resultou em maior concentração de fitase (3,38 vezes). Para a dessalinização e concentração da enzima, a ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos com 30 KDa de poro concentrou a enzima em 36,75 vezes em relação ao extrato bruto. As estratégias de purificação de alta afinidade utilizando os métodos de cromatografia de troca iônica, filtração em gel *Sephacryl* S-100 e S-400 não foram eficientes para a separação da fitase. O zimograma apresentou a presença de fitase de elevada massa molecular. Estudos de caracterização mostraram que a enzima apresenta pH ótimo entre 4,5 e 5,0 e termoestabilidade (de 80 a 90 °C por 30 min). A atividade da fitase foi ativada por Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} , Co^{2+} e Fe^{2+} , EDTA e K_2HPO_4 à 1 mM. Os valores cinéticos foram K_m 0,13 mM e $V_{máx}$ 52,91 $\mu\text{mol/ml.min}$. No estudo de inativação enzimática, obteve-se uma constante k igual a $0,0214 \text{ min}^{-1}$ e meia vida de 97,27 min à 50°C.

Palavras-chave: fitase, concentração, precipitação, purificação, zimograma, caracterização.

1 INTRODUÇÃO

Um bioprocesso é composto de etapas de *upstream* e *downstream*. *Downstream* consiste nas etapas de separação e de recuperação de um determinado bioproduto. Dentre as etapas, existem variados métodos como a clarificação, etapas de concentração e/ou purificação de baixa resolução ou alta resolução e tratamentos finais para separação da molécula-alvo (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005; LINN, 2009; SHANMUGAM, 2009). A definição das estratégias para purificação de enzimas dependem das características físico-químicas, tamanho, carga, estruturas e interações com outras moléculas no meio complexo (SHANMUGAM, 2009).

A precipitação por sais é a operação no qual a adição do mesmo provoca um aumento na força iônica no sistema, assim causando formação de proteínas precipitadas insolúveis, chama-se de *salting out* (ILLANES, 2008). Em *Downstream* de enzimas é comumente utilizado a separação por membranas. As membranas são seletivas em relação ao tamanho do poro, nos casos de técnicas de microfiltração e ultrafiltração. Este processo pode ser realizado por uma membrana semipermeável ou membranas de fibra oca (AEHLE, 2008; PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

O grau de purificação requerido para produtos biotecnológicos varia conforme a aplicação. Por exemplo, se o produto for terapêutico na forma injetável ou utilizado na formulação de um alimento, este deverá apresentar um grau elevado de pureza (SHANMUGAM, 2009). Por outro lado, bioprodutos que não são destinados ao consumo humano e animal, como por exemplo a produção de biocombustíveis, tais como o etanol de segunda geração não requer grau de pureza elevado. Assim, a estratégia utilizada para constituir as etapas de separação e recuperação de um bioproduto dependerá do grau de pureza requerido, bem como das propriedades e características do bioproduto a ser purificado. Para enzimas, que são sensíveis a condições extremas de pH, força iônica, temperatura e agitação, maior cuidado deve ser tomado antes da definição das etapas de *downstream*. Custos de operação também devem ser considerados.

Uma variedade de métodos têm sido aplicada e relatada na literatura para a separação e recuperação de fitases microbianas. Alguns estudos

relatam a precipitação com sulfato de amônio (SASIREKHA et al., 2012), ultrafiltração (ZHANG et al., 2013b), cromatografias de troca iônica e cromatofocalização (SPIER et al., 2011b), e cromatografia de exclusão molecular (XU et al., 2012), bem como a combinação de etapas de purificação.

Greiner e colaboradores (2009) purificaram a fitase de *A. niger* 11T53A9 por métodos sequenciais. Iniciou-se com a precipitação com sulfato de amônio 90% de saturação, seguido de cromatografia iônica DEAE-*Sepharose* (aniônica) e CM-*Sepharose* CL 6B (catiônica fraca). Após, as frações reunidas com atividade de fitase foram aplicadas em gel filtração *Sephacryl* S-200 HR e seguida de cromatografia de troca iônica Mono S HR 5/5 (catiônica forte). Zhang e colaboradores (2013b) recuperaram a fitase de *Lentinus edodes* por contínuas etapas. Os procedimentos foram: cromatografias DEAE-*cellulose*, CM-*cellulose*, Q-*Sepharose*, *Affi-gel blue gel*, e a última etapa foi de cromatografia por gel filtração *Superdex* 75. A vista desses estudos, é imprescindível uma elucidação criteriosa para purificação de fitases. Desta forma, é na etapa de recuperação que a qualidade do produto aumenta substancialmente, uma vez que os processos são altamente seletivos, removendo as impurezas.

Além disso, pesquisas têm sido desenvolvidas visando à caracterização da proteína de interesse. Estudos sobre a termotolerância de fitases têm o intuito de solucionar alguns problemas durante os processos indústrias de alimentos para animais, visto que no processo de peletização da ração animal a fitase precisa ser termoestável a altas temperaturas (NASCIMENTO, 2011; USHASREE et al., 2011).

Fitases resistentes a temperaturas elevadas têm sido reportadas na literatura. Nampoothiri e colaboradores (2004) estudaram a termoestabilidade de fitase de *Thermoascus aurantiacus*, a qual reteve 80% da atividade enzimática à 70°C. Duas fitases termoestáveis foram identificadas e isoladas de *A. japonicus* BCC18313 (TR86) e *A. niger* BCC18081 (TR170) e demonstraram que ambas reteram 50% de atividade enzimática à 100°C por 10 minutos (PROMDONKOY et al., 2009).

Sobre purificação e caracterização de fitases de macromicetos, há poucos trabalhos em comparação com os estudos de purificação de fungos

filamentosos, bactérias e leveduras. Alguns estudos reportados na literatura sobre fitases de macromicetos contemplam purificação, caracterização e identificação de fitases do basidiomata (corpos de frutificação), porém não provenientes de processos fermentativos como, *Agaricus bisporus* (COLLOPY e ROYSE, 2004), *Volvariella volvacea* (XU et al., 2013), *Flammulina velutipes* (ZHU et al., 2011), *Lentinus edodes* (ZHANG, et al, 2013b), *S. commune* (ZHANG et al., 2013a), *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., e *Trametes pubescens* (LASSEN et al., 2001).

Os objetivos do capítulo V foram recuperar a fitase por estratégias de purificação de baixa e alta resolução e caracterizar da enzima de *Ganoderma* sp. MR-56 produzida por cultivo submerso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado no presente trabalho foi *Ganoderma* sp. MR-56, conforme descrito no subitem 2.1 do capítulo III.

2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDA DO SUBSTRATO PARA O CULTIVO SUBMERSO

O preparo do substrato para o cultivo submerso foi conduzido conforme descrito no subitem 2.2 do capítulo III.

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO PARA O CULTIVO SUBMERSO

O pré-tratamento do extrato de farelo de trigo foi conduzido conforme descrito no subitem 2.3 do capítulo III.

2.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

O preparo do pré-inóculo foi conduzido conforme descrito no subitem 2.4 do capítulo III.

2.5 PRODUÇÃO DE FITASE POR CULTIVO SUBMERSO

Os experimentos de cultivo submerso foram conduzidos conforme descrito no subitem 2.5 do capítulo III.

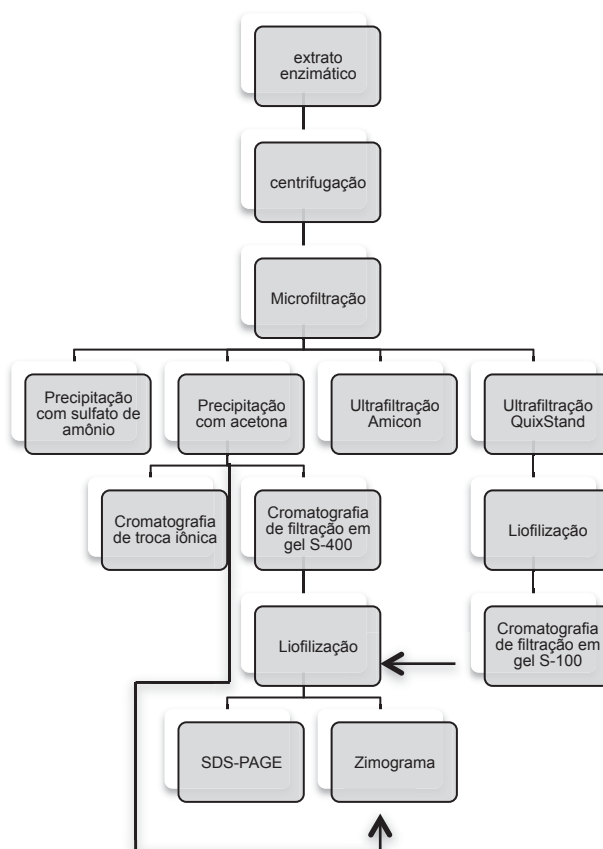
2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação da atividade fitásica foi realizada conforme descrito no subitem 2.6 do capítulo III.

2.7 FLUXOGRAMA DA SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA FITASE

Neste capítulo foi realizado diversas operações unitárias para a recuperação da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 produzidas por cultivo submerso. O processo proposto foi dividido em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação por centrifugação seguida de microfiltração); purificação de baixa resolução (precipitação com sal, solvente orgânico, ultrafiltração por dispositivos em tubos e por membranas de fibra oca); purificação de alta resolução (cromatografias de troca iônica e gel filtração S-100 e S-400). As amostras purificadas foram submetidas à SDS-PAGE para análise do perfil proteico. A FIGURA 15 apresenta o fluxograma das operações da recuperação da fitase.

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DAS OPERAÇÕES DE RECUPERAÇÃO DA FITASE



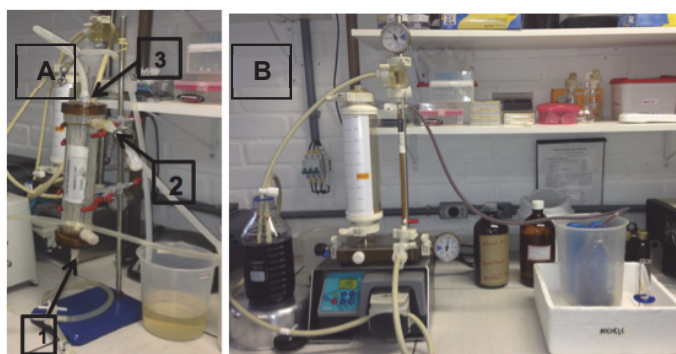
2.7.1 Centrifugação do extrato bruto enzimático

Após a produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso em extrato aquoso de farelo de trigo 20% (m/v) tratado (subitem 2.3 capítulo III) e otimizado (capítulo III), o caldo enzimático foi submetido a centrifugação 7.000 rpm por 15 minutos à 4°C. Separou-se o sobrenadante da biomassa, chamado de extrato bruto enzimático a parte superior, o qual foi mantido sob refrigeração (4°C) para posteriores estudos.

2.7.2 Clarificação do extrato bruto enzimático por microfiltração

O volume de extrato bruto enzimático foi clarificado por microfiltração em membranas de polietersulfona de porosidade 0,1 µm (Sartorius, Alemanha) (FIGURA 16 A). O sistema operou em vazão de 2 mL / min. As frações obtidas denominadas P (permeado) e R (retentado) foram analisadas quanto a atividade enzimática conforme descrito no subitem 2.6.

FIGURA 16 – A: SISTEMA DE MICROFILTRAÇÃO (SARTORIUS, ALEMANHA) COM CARTUCHO DE POROSIDADE 0,1 µm. (1) ALIMENTAÇÃO DA AMOSTRA; (2) FRAÇÃO RETIDA; (3) FRAÇÃO PERMEADA MICROFILTRADA; B: SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL QUIXSTAND (GE HEALTHCARE, SUÉCIA). FONTE: A AUTORA (2014).



2.7.3 Métodos de purificação de baixa resolução

Dois testes de precipitação foram realizados. Um deles utilizando o sal (*salting out*) e outro precipitação com solvente, visando avaliar qual dos processos de precipitação apresentaria maiores rendimentos.

2.7.3.1 Precipitação com sulfato de amônio (*Salting out*)

A precipitação com sulfato de amônio (P.A.) foi conduzida em concentrações de saturação de 40, 60 e 80% com agitação magnética branda, conforme a tabela Scopes (1994). Após a adição do sal, as amostras foram

distribuídas em microtubos de 2 mL e armazenadas sob refrigeração (4°C) durante uma hora. Os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos para a precipitação das proteínas. Os sobrenadantes foram separados e os precipitados foram ressuspensos com água ultra pura e a dessalinização da amostra foi conduzida em ultrafiltros de 10 KDa (Amicon, Millipore, Alemanha). Após a precipitação, foram realizados os ensaios de determinação da atividade fitásica conforme o item 2.6.

2.7.3.2 Precipitação com solvente (acetona)

A precipitação de proteínas com solvente orgânico acetona P.A. foi determinada usando a proporção de 1:5 (1 volume de extrato enzimático clarificado para 5 volumes de acetona) e 1:10, previamente armazenada a -20°C. A amostra foi homogeneizada e armazenada a -20 °C por 30 minutos. A amostra então foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos e separada as fases. A formação de precipitado (*pellet*) na parte inferior foi seco a 37°C em estufa à vácuo para a evaporação do solvente. O “*pellet*” foi ressuspenso em água ultra pura e a determinação da atividade fitásica (subitem 2.6).

2.7.3.3 Ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos

Cinco mL do extrato bruto enzimático foram ultrafiltrados em dispositivos de ultrafiltração em tubos (utilizando ultrafiltros de 10, 30, 50 e 100 KDa de poro, Amicon, Millipore, Alemanha) sob centrifugação a 4.500 rpm por 20 minutos. As amostras foram separadas e denominadas de P (volume permeado, em mL) e R (volume retentado, em mL) e então realizada a determinação da atividade de fitase (subitem 2.6).

2.7.3.4 Ultrafiltração tangencial (QuixStand)

O extrato bruto enzimático foi processado em um sistema de ultrafiltração tangencial (modelo QuixStand Benchtop® GE Healthcare, Suécia) utilizando cartuchos de fibra oca “*Hollow fiber cartridge*” (GE Healthcare) de porosidade 300 e 10 kDa (FIGURA 17 B). As frações obtidas foram chamadas de P (permeado) e R (retentado). Os volumes inicial e final obtidos foram medidos. As amostras foram concentradas com pressão de 5 psi, vazão de 3 mL/min para a pressão de entrada e saída. As frações obtidas pelas filtrações foram submetidas à dosagem de atividade de fitase (subitem 2.6). Este estudo

foi conduzido com o objetivo de concentrar a enzima para as próximas etapas cromatográficas (como de cromatografia em gel *Sephacryl* S-100).

2.7.4 Métodos de purificação de alta resolução

2.7.4.1 Cromatografia de troca iônica

Primeiramente, o extrato enzimático precipitado com acetona foi submetido a diálise em Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com o auxílio do centricon de 10 KDa, para equilibrar a amostra com o pH do tampão para que a amostra se ligue na resina aniônica.

Realizou-se a cromatografia de troca iônica coluna Mono Q (característica forte trocador aniônico) acoplada ao sistema ÄKTA Amersham Biociences e o *software* Unicorn. Equilibrou-se a coluna com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl e Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 1 M, a 4°C. Utilizou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 1 mL. As amostras foram coletadas com o auxílio do coletor de frações automático (modelo SuperFrac, GE Healthcare, Suécia) em tubos de vidro. As frações que obtiveram as maiores valores de D.O. (densidade óptica) a 280 nm foram submetidas ao ensaio enzimático da atividade da fitase (descrito no item 2.6).

2.7.4.2 Cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-100

O concentrado enzimático (entre 300 a 10 KDa) ultrafiltrado proveniente do sistema Quixstand foi liofilizado para aumentar a concentração de fitase e o material seco foi suspenso com tampão acetato de amônio 20 mM pH 6,0. Esta amostra foi submetida a cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-100 (GE Healthcare, Suécia) acoplado ao sistema FPLC (*Purifier Fast Protein Liquid Chromatography*). A resina *Sephacryl* S-100 tem característica de separar peptídeos e proteínas menores de tamanho molecular entre 1 a 100 kDa. A coluna de filtração em gel foi equilibrada com o tampão acetato de amônio 20 mM pH 6,0 com um fluxo de 0,5 mL/min. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão e foram coletadas frações de 3 mL, as frações com maiores valores de D.O. a 280 nm foram submetidas a liofilização e posteriormente ao ensaio da atividade de fitase (subitem 2.6).

2.7.4.3 Cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-400

O extrato enzimático precipitado com acetona foi submetido a cromatografia de filtração em gel utilizando a *Sephacryl* S-400 (GE Healthcare, Suécia) que possui separação de moléculas de tamanho entre 20 a 8000 kDa. A coluna de gel-filtração foi equilibrada com o tampão acetato de amônio 20 mM pH 6,0 com um fluxo de 0,5 mL/min. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão e foram coletadas frações de 3 mL. As amostras com maiores valores de D.O. a 280 nm foram submetidas a liofilização e posteriormente ao ensaio da atividade de fitase (subitem 2.6), determinação de proteínas (subitem 2.8), a SDS-PAGE e o gel nativo (subitem 2.10 e 2.11).

2.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas das amostras foi determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976).

2.9 LIOFILIZAÇÃO

As amostras purificadas foram previamente congeladas em *ultra-freezer* (U 570 Premium/ New Brunswick Scientific) a -80°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras congeladas foram submetidas ao processo de liofilização (Liofilizador ModulyoD, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) por 48 horas.

2.10 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com espessura de 0,1 mm foi realizada conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970) para avaliar o perfil proteico da amostra. O experimento foi realizado com o kit de eletroforese da BIO-RAD. O marcador molecular SM0431 (Fermentas) contendo os respectivos padrões e pesos moleculares foi utilizado: β -galactosidase (116 kDa) albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (34 kDa), REase Bsp 98I (25 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa), lisoenzima (14,4 kDa). A corrida eletroforética das amostras foi conduzida à 100 V (0,015 amperes) e corado com azul de *Coomassie blue* R-250. O descoramento do gel foi realizado por

uma solução que continha metanol 45%, ácido acético glacial 10% e água destilada 45%.

2.11 ZIMOGRAMA DA FITASE

A técnica de zimograma foi realizada com o intuito de revelar bandas proteicas com atividades de fitase. As amostras oriundas da separação de *Sephacryl* S-400 (fração 03) foram inicialmente liofilizadas, dissolvidas em água ultra pura e dialisadas em dispositivos de ultrafiltração de 10 kDa (Centricon, Millipore, Alemanha). A amostra foi precipitada com acetona para a remoção de interferentes e debris celulares.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel nativo (*NATIVE-PAGE*), ou também chamado não desnaturante com tampão de amostra 2x concentrado (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, glicerol 0,8 mL, água destilada 0,4 mL e azul de bromofenol 2%) sem nenhum agente redutor. O preparo do gel e a corrida eletroforética seguem o mesmo procedimento descrito no subitem 2.10. Após a corrida, o gel foi incubado com tampão acetato 100 mM pH 5 contendo 1 mg mL⁻¹ de 4-MUP (Sigma Aldrich, Alemanha) por 15 minutos com agitação branda. Após a incubação, o gel foi observado em um transiluminador com luz UV para a revelação das bandas com atividade de fitase com característica fluorescente.

2.12 CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56

2.12.1 Estudo do efeito do pH na atividade da fitase

O pH ótimo da reação enzimática foi determinado usando diferentes soluções tampão: pH 1,0-3,5 (0,1M glicina-HCl), pH 4,0-5,5 (0,1M acetato de sódio-HCl), pH 6-7 (0,1M Tris-ácido acético), pH 7,5-8,5 (0,1M Tris-HCl), 9-10 (0,1M glicina-NaOH). A análise da atividade da fitase (U mL⁻¹) das amostras concentradas em dispositivos de ultrafiltração de centrifugação em tubos (conforme subitem 2.7.3.3) foi realizada durante a reação enzimática (subitem 2.6) em diferentes valores de pH de 1 a 10. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.12.2 Estudo do efeito da temperatura na atividade da fitase

O efeito da temperatura na atividade de fitase foi determinada incubando o extrato enzimático concentrado em dispositivo de ultrafiltração de centrifugação em tubos (subitem 2.7.3.3) em banho-maria por 30 minutos nos seguintes intervalos de temperatura: 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Após a incubação, a atividade da fitase foi determinada pelo método descrito no subitem 2.6. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.12.3 Estudo da influência dos íons metálicos e edta na atividade da fitase

A ativação ou inibição da atividade da fitase por diferentes íons metálicos e EDTA foi avaliada em soluções do extrato enzimático concentrado em dispositivo de ultrafiltração de centrifugação em tubos (subitem 2.7.3.3), contendo a concentração final de 1 mM dos seguintes íons na forma dos sais sulfatos: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ e EDTA sódico durante o ensaio enzimático (subitem 2.6).

2.12.4 Estudo da influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase

O estudo do efeito de fosfato inorgânico (KH_2PO_4) na atividade da fitase durante a reação enzimática foi realizada em diferentes concentrações (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 e 5 mM) e adicionadas ao extrato enzimático concentrado em dispositivo de ultrafiltração em tubos (subitem 2.7.3.3). A atividade da fitase foi determinada pelo método de Heinonen e Lahti (1981) (subitem 2.6) e os ensaios realizados em triplicata.

2.12.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima ($v_{máx}$) e afinidade enzima-substrato

Para avaliar a afinidade enzima-substrato, foram realizados ensaios de atividade enzimática utilizando as seguintes concentrações de fitato de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha): 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 e 5 mM. A atividade da fitase foi determinada conforme o subitem 2.6. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram obtidos a partir do método de linearização de Lineweaver–Burk (LINEWEAVER e BURK, 1934).

2.12.6 Determinação da constante de velocidade de reação (k), meia vida da enzima e estabilidade térmica da fitase

Para a determinação da constante k foi realizada um cálculo a partir do coeficiente angular (inclinação) da reta obtida do gráfico plotado em escala monologarítmica a variável atividade enzimática residual (%) em função do tempo de incubação (minutos) (SCHMIDELL et al., 2001).

A estabilidade térmica da fitase foi determinada incubando-se o extrato enzimático em banho-maria à 50°C nos seguintes intervalos de tempo: 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após a incubação, a atividade da fitase foi determinada pelo método descrito no subitem 2.6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A taxa de inativação enzimática foi determinada pela reação de primeira ordem por meio das seguintes equações:

$$\%A = \%A_0 e^{-kt} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\ln \frac{\%A}{\%A_0} = -kt \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde, A_0 = atividade enzimática inicial e A = atividade enzimática residual.

A meia vida da enzima, que corresponde ao tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida à metade da atividade inicial, foi calculada através da equação:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k} \quad (\text{Eq. 10})$$

A qual resultou da seguinte equação (para a inativação enzimática que obedece à equação simples de primeira ordem):

$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = -k t_{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 11})$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de purificação de baixa resolução aplicados, como os de precipitação com sulfato de amônio e acetona obtiveram resultados

satisfatórios para fitase, principalmente com o sal de saturação a 80% que concentrou a enzima 3,38 vezes. A ultrafiltração com dispositivos de centrifugação em tubos de 30 kDa foi a qual mais concentrou a enzima (36,75 vezes). No entanto, a ultrafiltração tangencial apresentou uma menor eficiência. A fração retida do cartucho de 300 kDa apresentou concentração da fitase de 1,13 vezes. As estratégias de purificação de troca iônica, filtração em gel S-100 e S-400 não obtiveram resultados positivos, ou seja, não houve purificação efetiva da enzima. O zimograma da fitase estimou o tamanho da enzima com alta massa molecular.

3.1 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO

3.1.1 Clarificação do extrato bruto enzimático por microfiltração

O extrato bruto enzimático foi microfiltrado (0,1 μm) e a atividade enzimática durante esta etapa não foi afetada (TABELA 20). Desta forma, partículas insolúveis, debris celulares e células microbianas foram removidas.

3.1.2 Precipitação com sulfato de amônio e acetona

Os métodos de precipitação com sulfato de amônio e acetona são amplamente utilizados para a concentração de proteínas. A precipitação com sulfato de amônio a 80% foi a mais efetiva em relação as demais precipitações, a qual concentrou 3,38 vezes em relação ao extrato bruto inicial (sem adição de sulfato de amônio) (TABELA 19). Referente ao extrato bruto inicial, notou-se que houve um aumento proporcional na atividade da fitase com o aumento da concentração (%) de saturação de sulfato de amônio. Com a precipitação por solvente (acetona), a atividade de fitase foi concentrada 1,23 vezes quando a proporção 1:10 foi utilizada e a menor concentração de fitase (0,66 vezes) foi obtida com a proporção 1:5. Comparando as duas técnicas de precipitação, observa-se que a precipitação por sais (sulfato de amônio) foi melhor que a precipitação por solvente (acetona), sendo então indicada para a concentração de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56. Foi aplicado o *Tukey's multiple comparisons test*, que resultou que todas as precipitações com sulfato de amônio (40, 60 e 80% de saturação) e acetona

(1:5 e 1:10) foram significativas ($p < 0,05$) quando comparadas entre si e ao extrato bruto (sem adição de sal ou solvente).

Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados na literatura, ou seja, aumentaram a concentração da enzima, porém os valores encontrados são inferiores em relação ao presente estudo. De acordo com Farouk e colaboradores (2012), a fitase de *Enterobacter sakazakii* concentrou em 0,8 vezes por sulfato de amônio a 80% de saturação. Greiner e colaboradores (2009) usaram sulfato de amônio a 90% de saturação para precipitar fitase de *A. niger* 11T53A9 e atingiu concentração de 1,7 vezes. Já a fitase de *Pseudomonas aeruginosa* p6 foi precipitada a 60% de sulfato de amônio e concentrou 1,6 vezes (SASIREKHA et al., 2012). A fitase de *Klebsiella pneumoniae* 9-B foi precipitada com sulfato de amônio a 80% e resultou em 1,22 vezes (ESCOBIN-MOPERA et al., 2012). Nos estudos de Singh e Satyanarayana (2009) a precipitação com acetona a 80% foi utilizada como a primeira etapa de purificação da fitase de *S. thermophile* e concentrou 1,8 vezes a mesma.

TABELA 19 - RESULTADOS DOS ESTUDOS DE PRECIPITAÇÃO POR SAIS E PRECIPITAÇÃO POR SOLVENTE DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56. LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)

Experimentos	Atividade	Concentração (vezes)
	fitásica total (U total)	
Extrato bruto inicial	400 ^a	-
Sulfato de amônio 40%	616 ^b	1,54
Sulfato de amônio 60%	868 ^c	2,17
Sulfato de amônio 80%	1355^d	3,38
Volume amostra:acetona (1:5)	266,66 ^e	0,66
Volume amostra:acetona (1:10)	494,87 ^f	1,23

% de saturação.

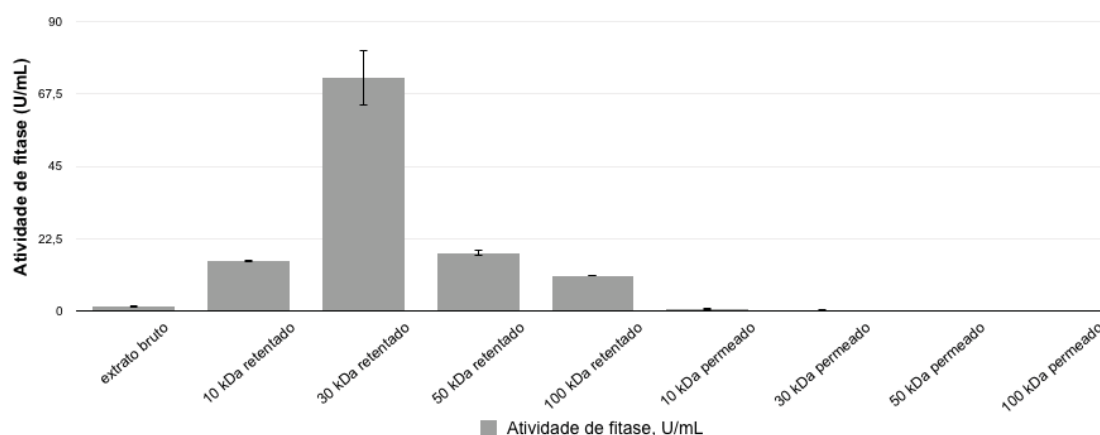
3.1.3 Ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos

A ultrafiltração é amplamente utilizada para a concentração e separação parcial de biomoléculas com base no seu tamanho molecular. Neste estudo, a ultrafiltração foi utilizada para concentrar e para estimar a faixa de tamanho molecular provável da enzima fitase produzida por *Ganoderma* sp. MR-56. A FIGURA 17 mostrou que o retentado ≥ 30 KDa concentrou 36,75 vezes a enzima, seguida o retentado ≥ 50 KDa que concentrou 9,18 vezes. O retentado ≥ 10 KDa também resultou em um efeito positivo na concentração

da enzima, concentrou 7,89 vezes. Sugere-se que a fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresente tamanho molecular acima de 10 kDa. Estudos mais aprofundados de separação são requeridos para maior precisão de seu tamanho molecular como SDS-PAGE e zimograma.

Os resultados do presente estudo corroboram com os estudos de Salmon e colaboradores (2012), os quais também realizaram etapa de ultrafiltração em tubos para a purificação de baixa resolução da fitase produzida por *S. commune* e estimaram a faixa de tamanho molecular da fitase por ultrafiltração sendo ≥ 10 kDa. Não foi possível afirmar com segurança o tamanho molecular da fitase de *S. commune*. A ultrafiltração da fração retida de 30 kDa resultou na concentração de 13,3 vezes, seguida da fração ≥ 50 KDa que concentrou 11,4 vezes a enzima.

FIGURA 17 - ULTRAFILTRAÇÃO EM DISPOSITIVOS DE CENTRIFUGAÇÃO EM TUBOS DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma* sp. MR-56 PARA CONCENTRAÇÃO DA FITASE



3.1.4 Ultrafiltração tangencial (QuixStand)

Os resultados das atividades de fitase de cada etapa de ultrafiltração tangencial conduzidas no sistema QuixStand Benchtop® (GE, Suécia) encontram-se na TABELA 20. A maior concentração da enzima (1,13 vezes) foi alcançada na fração permeada utilizando a membrana de 300 kDa de poro. As demais concentrações da enzima não foram efetivas. Desta forma, o volume obtido entre 10 e 300 kDa foi utilizado para as próximas etapas de purificação.

TABELA 20 - RESULTADOS DAS ETAPAS DE MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Ganoderma* sp. MR-56

Frações	Atividade Total (U total)	Concentração (vezes)
Extrato bruto inicial	14410	-
Microfiltrado 0,1 µm	14410	-
R 300 kDa	1505	1,06
P 300 kDa	16340	1,13
R 10 kDa	8060	0,55
P 10 kDa	2600	0,18

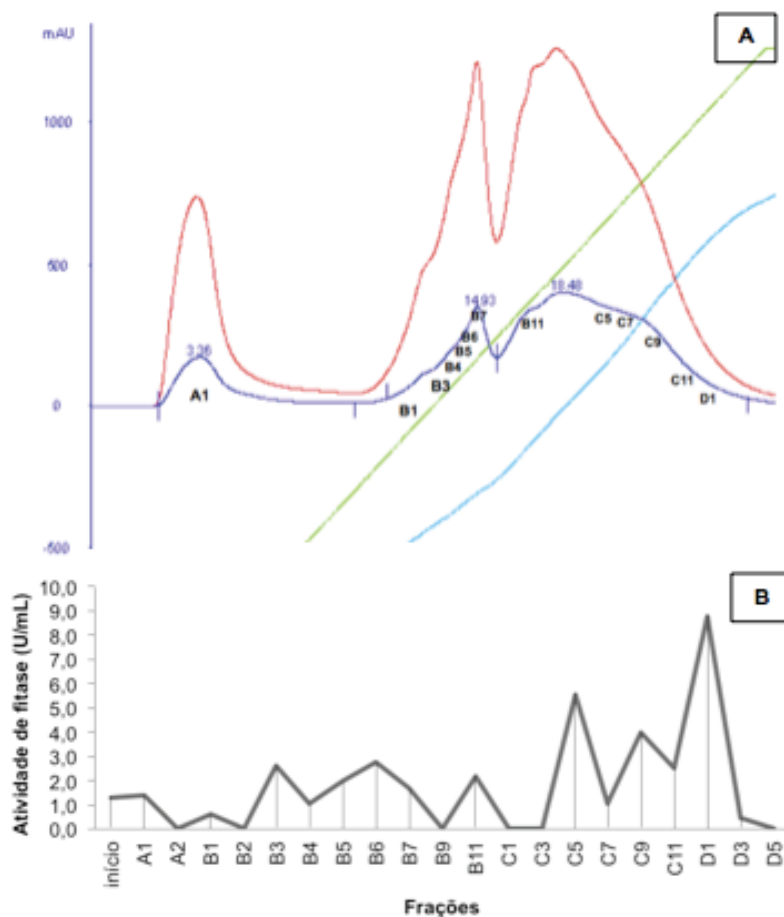
*a concentração foi calculada utilizando-se os dados de atividade total (U) total; P = permeado; R = retentado.

3.2 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO

3.2.1 Cromatografia de troca iônica

As frações coletadas da cromatografia de troca iônica que apresentaram maiores valores de densidade óptica (D.O. a 280 nm) foram submetidas à determinação da atividade da fitase (subitem 2.6). Conforme as FIGURA 18 A e B, observou-se que houve disparidade dos picos de atividade de fitase durante a cromatografia. O pico de fitase C5 (5,52 U mL⁻¹) está condizente com a D.O. a 280 nm. Os picos B1 a B7 também estão de acordo com a D.O. a 280 nm, porém baixas atividades de fitase (0,57 a 2,72 U mL⁻¹). Dentre eles o pico B6 mostra maior atividade de fitase de (2,72 U mL⁻¹). Os picos de B12 até C3 sem atividade enzimática não estão relacionados com os picos de elevados D.O. a 280 nm. Por esses motivos, a cromatografia de troca iônica MONO Q (aniônica) não foi eficiente para separação da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56. Portanto, foi escolhida outra estratégia de purificação.

FIGURA 18 – A: DENSIDADE ÓPTICA D.O. LINHA AZUL A 280 nm, D.O. LINHA VERMELHA A 220 nm, LINHA AZUL GRADIENTE SALINO %, LINHA VERDE GRADIENTE SALINO EM MOLAR. AS FRAÇÕES DE ATIVIDADE DE FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 ESTÃO INDICADAS COM LETRAS E NÚMEROS EM PRETO DA CROMATOGRAFIA ANIÔNICA MONO Q B: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA ATIVIDADE DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 NAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA RESINA MONO Q



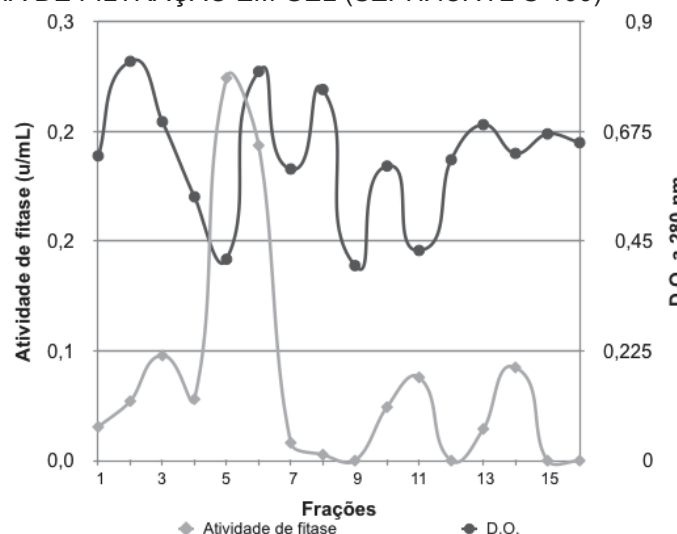
3.2.2 Cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-100

A purificação da fitase por cromatografia de troca iônica utilizando-se a resina aniônica MONO Q não resultou em uma boa separação da enzima. O rendimento deste método foi de 27,5% em relação à amostra inicial de fitase. Assim, optou-se por utilizar a cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-100 acoplado em sistema FPLC. Na FIGURA 19 é possível visualizar os *pools* (união de algumas frações) das frações de D.O. (280 nm) e as atividades de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 totalizando 16 *pools* de atividade fitásica (TABELA 21). A quantidade elevada de *pools* observados em D.O. a 280 nm é devido a característica do extrato enzimático. Nota-se que o extrato enzimático continha extrato de farelo de trigo e extrato de levedura, os quais são ricos em proteínas.

TABELA 21 - IDENTIFICAÇÃO DOS POOLS DAS FRAÇÕES DE D.O. A 280 nm DA CROMATOGRAPHIA EM GEL *SEPHACRYL* S-100

Pools	Frações
1	3 a 6
2	12 a 17
3	27 a 31
4	51 a 52
5	57 e 58
6	61 a 68
7	74 a 78
8	80 a 84
9	88 a 89
10	91 a 92
11	94 a 96
12	98 a 100
13	103, 105 e 108
14	111 a 119
15	121
16	125 e 126

FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO (D.O. 280 nm E ATIVIDADE FITÁSICA) DURANTE A CROMATOGRAPHIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (*SEPHACRYL* S-100)

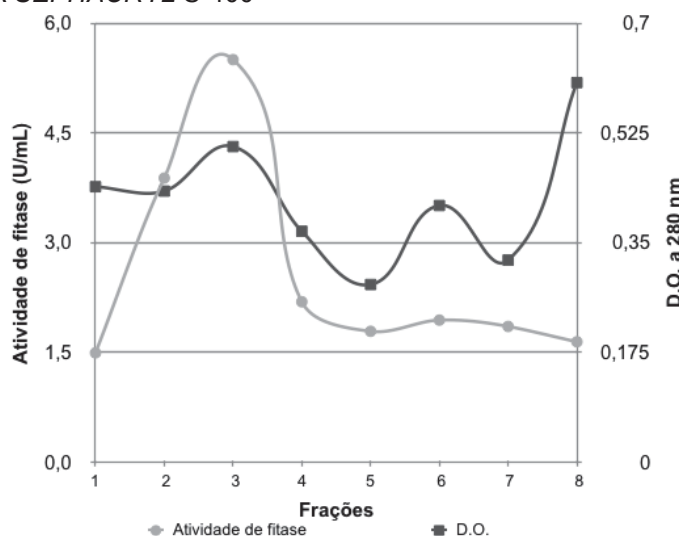


3.2.3 Cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-400

Como a estratégia de purificação de cromatografia de gel filtração *Sephacryl* S-100 (subitem 4.2.2) não possibilitou a separação da enzima fitase, foi proposto outra estratégia, o uso de outra resina *Sephacryl* S-400, com uma maior faixa de fracionamento (20 a 8000 kDa) para a tentativa de separação e purificação da fitase. O perfil cromatográfico por gel-filtração *Sephacryl* S-400 apresentou um pico proteico com atividade de fitase de 5,5 U

mL⁻¹ correspondente à fração 3 de D.O. a 280 nm de 0,503 de absorbância. A FIGURA 20 apresenta os resultados das atividades de fitase e os valores de D.O. (280 nm) obtidos. As frações foram dialisadas com o auxílio dos dispositivos Centricon de 10 kDa e liofilizadas para posterior análise eletroforética em SDS-PAGE. Não foi dado seguimento a outra etapa cromatografia após a etapa em *Sephacryl* S-400, pois o rendimento de recuperação de fitase foi de apenas 35%.

FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO DURANTE A CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL EM COLUNA *SEPHACRYL* S-400



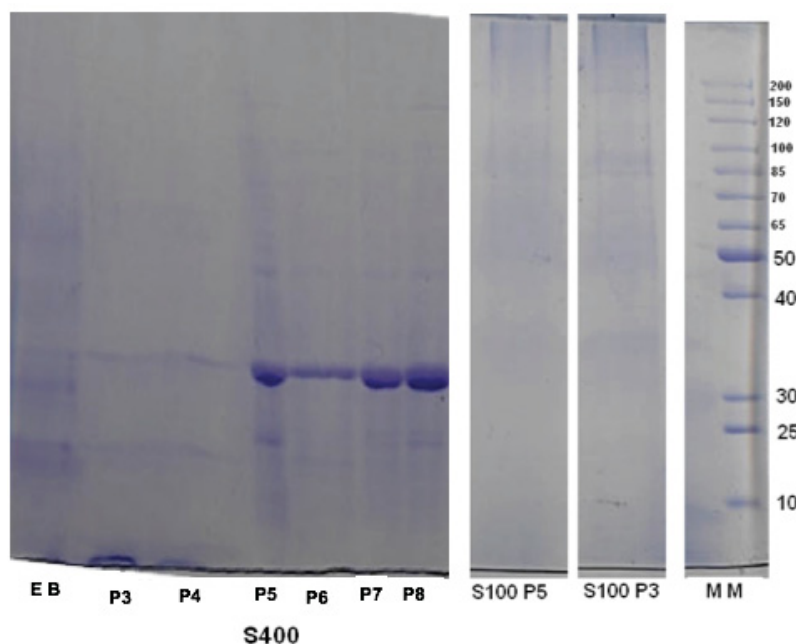
3.3 SDS-PAGE

Os géis obtidos após corrida eletroforética estão presentes na FIGURA 22 e mostram o perfil proteico das frações eluídas durante a cromatografia em coluna *Sephacryl* S-100, das frações da cromatografia *Sephacryl* S-400 e do extrato bruto. A FIGURA 21 apresentou perfis proteicos com muitas bandas de diferentes tamanhos moleculares. Assim, os métodos cromatográficos realizados não foram efetivos para a separação de proteínas de diferentes tamanhos moleculares. A quantidade de bandas proteicas nas amostras da S-400 foram: 27 no extrato bruto, 8 bandas da P3, 6 bandas da P4, 10 bandas da P5, 9 bandas da P6, 9 bandas da P7 e 10 bandas da P8. Nas amostras da S-100: 15 bandas em P3 e 13 bandas em P5.

Considerando-se que o substrato utilizado para a produção de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 continha extrato de farelo de trigo e que possui composição complexa dentre elas de origem proteica. Além disso, a

suplementação do meio com extrato de levedura (que também apresenta composição proteica), mesmo após o cultivo, ainda poderia haver a presença de proteínas além das hidrolisadas e outras sintetizadas pelo micro-organismo que influenciam o perfil proteico observado no gel SDS-PAGE, devido a presença de proteínas de diferentes tamanhos moleculares.

FIGURA 21 - SDS-PAGE DO EXTRATO BRUTO DE *Ganoderma* sp. MR-56, AMOSTRAS DAS CROMATOGRAFIAS S-100 (PICO 3 E 5), S-400 (PICO 3, 4, 5, 6, 7 E 8) E MM (MARCADOR MOLECULAR)



3.4 ZIMOGRAMA DA FITASE

No zimograma, o agente revelador 4-MUP foi responsável pelo aparecimento das bandas fluorescentes com atividade de fitase presentes no gel. Essa técnica é baseada na desfosforilação do agente fluorogênico cromogênico 4-MUP resultando em 4-MU e fosfato inorgânico. Esse reagente é utilizado para revelação de fosfatases alcalinas (GUIBAULT et al., 1968; FERNLEY e WALKER, 1965), porém pode ser utilizado também para identificar fitases, visto que essas enzimas também liberam fosfato inorgânico da molécula que a compõe.

O zimograma permitiu a visualização de uma banda fluorescente no extrato bruto (A) e três bandas proteicas fluorescentes na amostra purificada da amostra (B) fração 03 da cromatografia de filtração em gel *Sephacryl* S-400 (FIGURA 22). Todas as bandas foram localizadas na parte superior do gel. A partir desta análise sugere-se que as bandas proteicas fluorescentes

apresentam massa molecular elevada. Para uma análise mais precisa, a identificação da proteína seria seguida pela espectrometria de massa Maldi ToF-ToF e o sequenciamento realizado para análise da homologia com outras fitases presentes em bancos de dados.

Comparando as amostras, uma hipótese seria que o *Ganoderma* sp. MR-56 possivelmente produziu mais de uma fitase, ou isoenzimas ou outras fitases do mesmo grupo. Além disso, o substrato 4-MUP não é específico para fitases, e sim para fosfatases alcalinas. Outra hipótese seria que as bandas da amostra purificada poderiam ser as subunidades da fitase que se separaram durante a corrida eletroforética. O extrato bruto mostrou uma banda pois não foi submetido a nenhum processo cromatográfico de alta resolução, então a enzima estaria na sua forma estrutural nativa. Além disso, o *Ganoderma* sp. MR-56 não tem seu genoma totalmente sequenciado e depositado em banco de dados, com isso dificulta a identificação das sequências de fitases do microrganismo do presente estudo.

FIGURA 22 - GEL NATIVO DO ZIMOGRAMA DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56 (A) EXTRATO BRUTO E (B) FRAÇÃO 03 DA CROMATOGRÁFIA FILTRAÇÃO EM GEL SEPHACRYL S-400



3.5 CARACTERIZAÇÃO DA FITASE DE *Ganoderma* sp. MR-56

3.5.1 Efeito do pH na atividade da fitase

A atividade máxima de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 foi observada entre pH 4,5 e 5,0 (FIGURA 23 A), sendo o pH ótimo da enzima. A fitase incubada na faixa de pH entre 1,0 e 3,5 apresentou uma diminuição na atividade enzimática, bem como em pH entre 6,0 e 10,0. Conclui-se que a enzima exibiu baixa atividade em valores extremos de pH. Uma hipótese seria que a enzima do presente trabalho tem característica ácida, a qual em pH 4,0

e 5,0 possuem atividades estáveis. A maioria das fitases têm atividade entre 4,5-6,0 (ROOPESH et al., 2006). Fitases provenientes de cogumelos têm pH 5,0, conforme Salmon e colaboradores (2012), Zhang e colaboradores (2013b), Xu e colaboradores (2012) e Lassen e colaboradores (2001) os quais corroboram com o presente estudo.

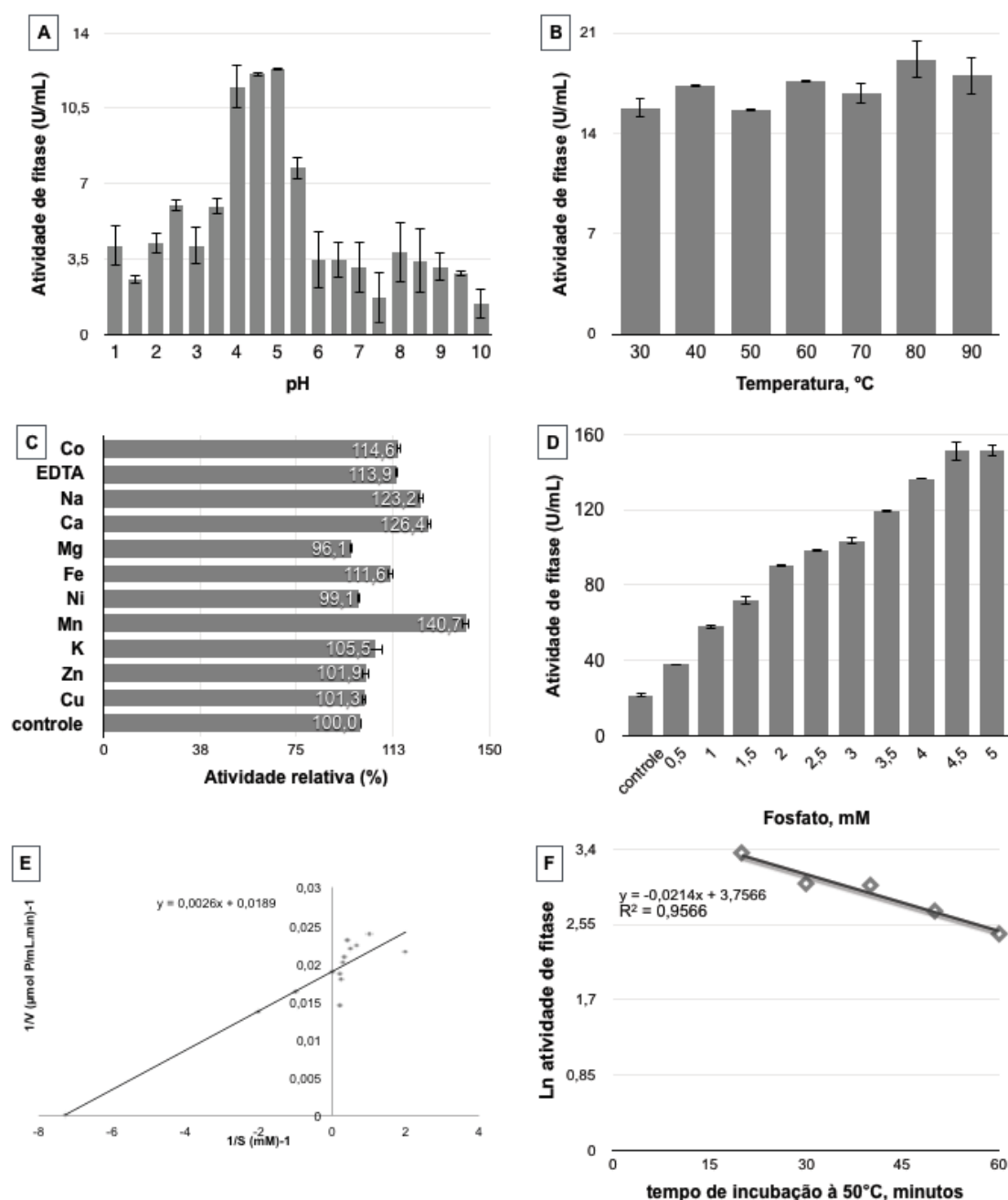
Casey e Walsh (2004) reportaram que enzimas com atividade significativa em pH 5,0 possuem prospecção para aplicação da fitase em ração, pois podem facilitar a degradação do fitato em glândulas salivares de suínos. In e colaboradores (2009) evidenciaram que fitases ácidas são mais aplicadas como aditivos alimentares, as quais liberam o fósforo inorgânico contido nos fitatos dos alimentos no trato digestório dos animais monogástricos. Portanto, a fitase do presente estudo condizem com os mesmos.

3.5.2 Efeito da temperatura na atividade da fitase

Observou-se que a fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresenta termoestabilidade nas temperaturas testadas, ou seja, reteve a sua capacidade catalítica parcial em todas as temperaturas durante 30 minutos de reação (FIGURA 23 B). A maior atividade de fitase foi obtida ($19,1 \text{ U mL}^{-1}$) quando incubada à 80°C durante 30 minutos. A enzima também apresentou elevada atividade (18 U mL^{-1}) à 90°C / 30 min. Nas temperaturas 30°C e 50°C foram as quais resultaram nas menores atividades de fitase e semelhantes, $15,8 \text{ U mL}^{-1}$ e $15,6 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente. Portanto, a enzima fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 possui um grande potencial comercial pelo fator da termoestabilidade, podendo resistir às condições de peletização da ração animal (temperatura de $70 - 90^{\circ}\text{C}$), sem haver perdas consideráveis de sua atividade durante essa operação unitária.

Dentre os relatos na literatura, Boyce e Walsh (2007) reportaram que uma fosfatase ácida produzida por *Mucor hiemalis* Wehmer reteve 61% de sua atividade original após o aquecimento por 5 minutos a 80°C . A enzima fitase de *F. velutipes* resultou em 60% da atividade residual em 80°C por 30 minutos (ZHU et al., 2011). Fitases de *P. spartinae* mostrou temperatura ótima de reação de 70 a 80°C (NAKAMURA et al., 2000), os quais também condizem com o presente estudo.

FIGURA 23 – A: EFEITO DE DIFERENTES VALORES DE pH PARA A DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56. B: EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA ATIVIDADE DA FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. C: EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS METÁLICOS (1mM) NA ATIVIDADE DE FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. D: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO INORGÂNICO NA ATIVIDADE DE FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56 DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA. E: GRÁFICO DE LINEARIZAÇÃO POR LINEWEAVER BURK PARA A DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES K_M E $V_{MÁX}$ DA FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56. F: INATIVAÇÃO TÉRMICA DA FITASE DE *Ganoderma sp.* MR-56 À 50°C



3.5.3 Efeito dos íons metálicos e edta na atividade da fitase

O efeito de diferentes íons metálicos na concentração final de 1 mM foram avaliadas nas soluções do extrato enzimático concentrado em dispositivo de ultrafiltração em tubos quanto a ativação ou inibição da atividade fitásica durante a reação enzimática (FIGURA 23 C). Um experimento controle foi realizado sem adição de íons metálicos. A fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 foi ativada pela maioria dos íons metálicos estudados. A maior ativação foi observada em 40,7% com a adição de Mn^{2+} , 26,37% com Ca^{2+} , 23,2% com Na^{+} , com 14,6% com Co^{2+} , 13,89% com EDTA e 11,5% com Fe^{2+} . Similarmente em resultados encontrados na literatura, observou-se que a fitase produzida por *S. commune* foi fortemente ativada (269%) pelos íons Mn^{2+} a 1 mM (SALMON et al., 2012). Da mesma forma, a fitase de *A. niger* foi ativada por íons Mn^{2+} , porém com concentração de 200 mM (CASEY e WALSH, 2003). Os resultados apresentados corroboram com Lan e colaboradores (2011), em que a fitase proveniente de *Mitsuokella jalaludini* também é ativada por íons Mn^{2+} e Ca^{2+} , no entanto a concentração final de 100 mM, e também refere que a enzima não foi inibida pelo quelante EDTA. As fitases denominadas *Phy* I e *Phy* II de *Aspergillus niger* NCIM 563 na presença de EDTA 1 mM a *Phy* I foi estimulada, enquanto a *Phy* II foi inibida. A ativação da *Phy* I por EDTA corrobora com o presente estudo (SONI et al., 2010). Segundo Metzler e Metzler (2001), algumas enzimas têm outra região na molécula, o sítio alostérico, afastada do sítio ativo. No sítio alostérico moléculas e alguns íons metálicos se ligam e causam alterações na conformação proteica que afetam o sítio ativo, ativando ou inibindo a atividade enzimática.

3.5.4 Estudo da influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase

O resultado desse estudo está demonstrado na FIGURA 23 D. Diferentes concentrações de fosfato inorgânico KH_2PO_4 (0,5 a 5,0 mM) foram avaliadas durante a reação enzimática. O controle (extrato enzimático concentrado em dispositivo de ultrafiltração em tubos sem adição de fosfato) apresentou menor atividade da fitase em relação às atividades adicionadas de diferentes concentrações de fosfato inorgânico, as quais induziram

gradualmente a atividade da enzima. Portanto, nas concentrações de fosfato inorgânico de 4,5 e 5,0 mM ocorreu maior indução (em torno de 600%) quando comparado ao experimento controle. Por outro lado, não houveram repressões ou inibições da atividade da enzima. Contrapondo o presente trabalho, a fitase de *Cryptococcus laurentii* foi progressivamente inibida por KH_2PO_4 de 0,005–10mM, entretanto na concentração 0,5 mM de fosfato inorgânico a enzima já era completamente inibida (STADEN, et al., 2007).

3.5.5 Determinação das constantes de michaelis-menten (k_m), velocidade máxima ($v_{\text{máx}}$) e afinidade enzima-substrato

O estudo do complexo da enzima fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 foi realizado com substrato fitato de sódio em diversas concentrações (Sigma Aldrich, Alemanha). A afinidade do fitato de sódio mostrou ter uma velocidade de reação de 2,645 mmol de fósforo inorgânico liberado por mL.min na concentração de 4,5 mM (FIGURA 23 E). A aplicação da linearização pelo método de Lineweaver-Burk resultou nos valores de K_m de 0,13 mM e $V_{\text{máx}}$ de 52,91 $\mu\text{mol/mL.min}$. Soni e colaboradores (2010) obtiveram valores de K_m 0,156 mM e $V_{\text{máx}}$ de 220 $\mu\text{mol/min}$ da fitase produzida por *A. niger* NCIM 563 em FES. Salmon e colaboradores (2012) apresentaram valores K_m e $V_{\text{máx}}$ de 0,16 mM e 1,85 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente de *S. commune* por FES. A phy II de *A. niger* NCIM 563 mostram K_m 0,145 mM e $V_{\text{máx}}$ 1,67 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Os resultados desses autores citados acima corroboram com o K_m do presente estudo. Greiner e colaboradores (2009) apresentou um K_m de 0,054 mM de *Aspergillus niger* 11T53A9 mais baixo, ou seja, maior afinidade pelo substrato fitato de sódio. A fitase de *P. oxalicum* PJ3 possui K_m 0,545 mM e $V_{\text{máx}}$ de 600 U mg^{-1} de proteína (LEE et al., 2015). A determinação das constantes de *R. stolonifer* resultou em K_m e $V_{\text{máx}}$ 0,692 mM e 0,780 $\mu\text{mol min}^{-1}$, respectivamente (MONTEIRO et al., 2012), os quais não condizem com o presente trabalho.

3.5.6 Estudos da inativação enzimática, determinação da constante k e meia vida da enzima

A fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresentou uma constante k de 0,00214 min^{-1} e meia vida de 97,27 min à 50°C (FIGURA 23 F). Salmon e

colaboradores (2012) apresentaram uma constante k de $0,0143 \text{ min}^{-1}$ e meia vida de 48 min à 50°C de fitase de *S. commune*, valores menores quando comparados com o presente estudo. Jermutus e colaboradores (2001) apresentaram o tempo de meia vida à 49°C de *A. niger* e *A. terreus* de 138 e 53 minutos, respectivamente. Kim e colaboradores (1999b) estudaram a meia vida da fitase de *A. ficuum* e *B. amyloliquefaciens* porém à 80°C , mostrou-se ativa por 0,2 e 42 minutos, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

Dentre as etapas de purificação de baixa resolução, a ultrafiltração em dispositivos de centrifugação em tubos foi a mais efetiva para concentração da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56, embora a ultrafiltração tangencial também apresentou efeito positivo na concentração da mesma. Em relação às técnicas de precipitação, a de adição de sulfato de amônio foi a qual obteve maior concentração da enzima em comparação à precipitação por solvente utilizada neste estudo. No entanto, as estratégias de purificação de alta resolução não foram eficientes para separação da fitase e as etapas deveriam ser combinadas. A fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresentou um pH ótimo entre 4,5 e 5,0 e temperatura ótima entre 80 e 90°C por 30 minutos, que apresenta uma propriedade termoestável, a qual é importante para aplicação industrial. Dentre os íons metálicos testados, os ativadores da enzima foram os cátions Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Co^{2+} e Fe^{2+} , EDTA, fosfato inorgânico e o inibidor Ni^{2+} . Os dados da cinética enzimática da fitase mostraram K_m $0,13 \text{ mM}$ e $V_{\text{máx}}$ $52,91 \mu\text{mol/ml.min}$ que concordam com a literatura, bem como os valores da constante k de $0,0214 \text{ min}^{-1}$ e meia vida da enzima de 97,27 min.

CAPÍTULO VI FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA E EM PÓ

RESUMO

Para o desenvolvimento de formulações de fitase na forma líquida e em pó foram testados diversos grupos de aditivos. O objetivo do presente capítulo foi selecionar e avaliar a influência da adição dos aditivos na estabilização da atividade enzimática durante o armazenamento em condições aceleradas. Os grupos de aditivos estudados foram: antimicrobianos, sais, açúcares, polímeros, antioxidantes, acidulantes, proteína, álcool e quelante. Quatro etapas foram realizadas. O primeiro estudo consistiu em avaliar influência dos aditivos durante a reação enzimática. O segundo estudo foi analisar a estabilidade da atividade da fitase na presença dos aditivos previamente selecionados da etapa anterior na forma líquida armazenada à 40°C por 15 dias. A terceira etapa, baseou-se em um delineamento Plackett-Burman (11/12) *Screening Design* para a avaliação da interação dos aditivos na formulação. As variáveis (aditivos) significativas foram: antimicrobiano A1 ($p < 0,009$), antioxidante O2 ($p < 0,006$) e o sal S1 ($p < 0,049$). A quarta etapa, um DCCR foi conduzindo para estudar os aditivos selecionados anteriormente em diferentes concentrações. Após quinze dias, os resultados indicaram que as concentrações dos aditivos antimicrobiano A1 0,21% e antioxidante O2 0,0021% foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Na formulação da fitase em pó, foram testados cinco polímeros encapsulantes, além de uma formulação base, em secagem por *spray dryer*. A formulação com o polímero E2 foi que apresentou maior atividade relativa de fitase após a secagem (120,74%) em comparação à atividade inicial na forma líquida. Da mesma forma, o polímero E2 foi o qual apresentou maior estabilidade (79,01% de atividade residual) após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Palavras-chave: fitase, formulação líquida, formulação em pó, estabilidade, aditivos, microencapsulação.

1 INTRODUÇÃO

A enzima fitase tem sido aplicada em ração animal e em alimentos para o consumo humano (BHAVSAR e KHIRE, 2014). As preparações comerciais de fitase estão disponíveis em forma líquida, em pó e granulada. As principais preparações de fitases encontradas no mercado na forma líquida e sólida são a Natuphos® (BASF, Alemanha) (EFSA, 2006), a Quantum™ (AB Vista, Reino Unido) (EFSA, 2008), a Phyzyme® (Danisco, Reino Unido) (EFSA, 2008) e a Ronozyme® (Novozymes e DSM, Dinamarca e Holanda) (EFSA, 2010). Assim, estudos têm sido desenvolvidos para formular produtos enzimáticos, com o objetivo de estabilizar a atividade da enzima (ZHANG et al., 2006). Enzimas como as fitases, por exemplo, necessitam apresentar resistência às condições de operação do processo de produção (peletização) assim como apresentar estabilidade durante a estocagem e aplicação no produto (SLOMINSKI et al., 2007). Estudos de estabilidade da enzima, *in vitro*, durante o período de armazenamento ou *shelf life*, referem-se a capacidade da enzima de manter sua atividade catalítica durante o bioprocesso até sua aplicação final (Ó' FÁGÁIN et al., 2003). Salmon e colaboradores (2012) estudaram a influência de conservantes, sais, estabilizantes, antioxidantes na estabilidade da fitase produzida por *S. commune* na forma líquida durante a estocagem sob temperatura ambiente, refrigeração e congelamento. Porém, os estudos sobre formulação de fitases ainda são limitados na literatura. Na literatura, a α -amilase de *A. niger* foi estabilizada com aditivo PEG a 1% (m/v) e azida sódica a 0,001% (m/v) (MONGA et al., 2011). Bourneow e colaboradores (2012) usaram o glicerol para estabilizar transglutaminase de *Providencia* sp. C1112. Miyake e colaboradores (1999) reportaram que a estabilidade da superóxido dismutase foi positiva com adição de ácido ascórbico.

Além disso, estudos sobre concentrações adequadas são importantes para a estabilização, para viabilizar economicamente além de respeitar a legislação específica (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). No Brasil, o órgão responsável sobre enzimas e aditivos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o MAPA (Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para aplicação em ração animal. Embora, em alguns casos, concentrações elevadas de aditivos podem não ser, necessariamente, mais

eficazes e, assim podem ter efeitos negativos (SALMON et al., 2012). Portanto, é importante estudar as interações enzima-estabilizantes e possíveis modificações na sua eficiência catalítica. O desenvolvimento de formulações otimizadas não só resultará a uma enzima mais eficiente, mas também poderá tornar-se economicamente atrativa em comparação com enzimas comerciais já existentes (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008; FARIA et al., 2008; OHTAKE et al., 2011).

O aumento da vida útil de formulações ou preparações enzimáticas tem sido um desafio, uma vez que algumas enzimas em soluções aquosas são intrinsecamente instáveis devido a uma variedade de reações químicas intra e intermoleculares, incluindo hidrólise, agregação, desamidação, oxidação, eliminação, e alterações na conformação estrutural, razões pelas quais podem resultar em uma perda de atividade enzimática (JIMÉNEZ et al., 2009; COSTANTINO et al., 1994; WINTERS et al., 1997). Para minimizar ou evitar esses tipos de reações ou alterações, Ohtake e colaboradores (2011) apresentaram uma série de aditivos utilizados para preservação de proteínas tais como açúcares, sais, polímeros, surfactantes e arginina.

Para acelerar o desenvolvimento de formulação, os estudos de estabilidade são muitas vezes conduzidos sob condições aceleradas. Essas condições podem ser de alta temperatura, alta umidade, iluminação intensa, extremos de pH, agitação, e ciclos de congelamento e descongelamento. Esses estudos são geralmente curtos, mas muito úteis na triagem de formulações de proteínas (WEIJERS e RIET, 1992; WANG, 1999).

Infelizmente, não existe um único método de estabilização de proteína. Devido à complexidade estrutural, interações enzima-aditivo e interações de inativação dos mecanismos das proteínas (WANG, 1999).

Além dos produtos comerciais serem apresentados na forma líquida, enzimas também podem ser submetidas a processos de secagem, pois facilita o manuseio do produto, a estabilidade e a redução da deterioração do produto na forma em pó (SLOTH et al., 2007). A secagem por atomização em *spray dryer* se baseia na secagem de soluções e de suspensões aquosas (líquidos de baixa ou alta viscosidade) em um produto seco e pulverizado, submetida ao atomizador dentro de uma câmara de ar quente. Assim, ocorre a rápida evaporação da água e a formação das partículas sólidas (PATTNAYAK,

2010).

A utilização de polímeros como agente encapsulante em processos de secagem de enzimas tem gerado novas alternativas para o desenvolvimento de produtos, pois proporciona a proteção do material em pó. Um dos materiais mais utilizados como encapsulante são polímeros que tenham como característica baixa higroscopicidade, para evitar a aglomeração das partículas e aroma neutro (CARVALHO, 2012; ANSELMO et al., 2006).

O objetivo deste capítulo foi desenvolver preparações na forma líquida e em pó de fitase com a adição de aditivos, bem como estudar estabilidade dessas formulações durante o armazenamento em condições aceleradas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado no presente trabalho foi o *Ganoderma sp.* MR-56, descrito conforme no subitem 2.1 do capítulo III.

2.2 PRODUÇÃO DE FITASE

Os procedimentos para produção da fitase por cultivo submerso em STR foram realizados conforme:

- Extração líquida do substrato farelo de trigo para o cultivo submerso (subitem 2.2 do capítulo III);
- Pré-tratamento do substrato para o cultivo submerso (subitem 2.3 do capítulo III);
- Preparo do pré-inóculo subitem 2.4 do capítulo III;
- Produção da enzima por cultivo submerso em biorreator STR (subitem 2.6 capítulo IV);
- Clarificação por microfiltração e ultrafiltração foram realizados conforme descritos no Capítulo V no subitem 2.7.2 e subitem 2.7.3.3, respectivamente.

2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após a produção de fitases descritas no subitem 2.2, as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro transparente com capacidade de

total de 15 mL e cada formulação continha um volume final de 10 mL. Os volumes mantinham 1/3 do volume do frasco de *headspace* de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Os aditivos foram diluídos e/ou solubilizados em água ultra pura e posteriormente misturados com o extrato enzimático concentrado para obter a concentração final desejada. O CONTROLE realizou-se sem adição de aditivos, foi adicionada água ultra pura com a finalidade da diluição igualasse em todas as formulações.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FITASE

A atividade da fitase foi determinada conforme método de Heinonen e Lahti (1981) (subitem 2.6 do Capítulo III). Cada ensaio enzimático da forma líquida, a atividade inicial (tempo 0) foi determinada e considerada 100% de atividade relativa de enzima.

2.5 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA

Os aditivos utilizados nos estudos de formulação e estabilidade da fitase na forma líquida e em pó estão codificados e preservados pelo depósito de patente.

2.5.1 Estudo de estabilidade em condição acelerada

Os ensaios foram reproduzidos em triplicata, sendo que as amostras foram incubadas em estufa a 40 ± 2 °C durante 15 dias. Posteriormente, as amostras foram determinadas as atividades da fitase (item 2.4) e realizadas análises estatísticas.

2.5.2 Legislação

Os aditivos utilizados no presente capítulo estão de acordo com:

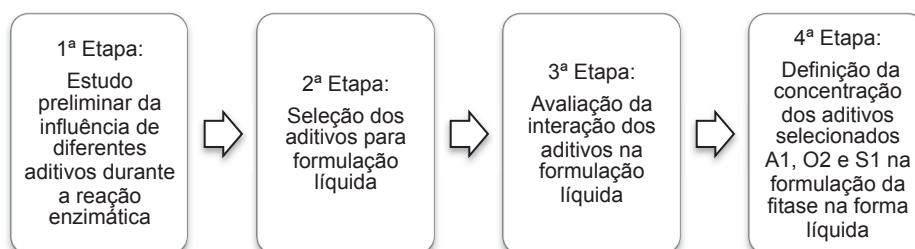
- ANVISA - Resolução - RDC nº 53, de 7 de outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;
- ANVISA - Resolução - RDC nº 54, de 7 de outubro de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico de enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;

- PORTARIA N° 540 - SVS/MS (Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde), 27 de outubro de 1997, Aditivos Alimentares;
- Resolução CNS/MS (Conselho Nacional da Saúde/ Ministério da Saúde) nº 04, de 24 de novembro de 1988 - Aditivos Intencionais;
- Instrução Normativa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal.

Como não existe nenhuma legislação específica e nem metodologias padrão para estudos de estabilidade de enzimas, os estudos apresentados neste trabalho basearam-se no ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) e no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).

Os estudos de formulação e estabilidade da fitase na forma líquida foram realizados em quatro etapas, descritos a seguir (FIGURA 24):

FIGURA 24 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE



2.5.3 Primeira etapa: Estudo preliminar da influência de diferentes aditivos durante a reação enzimática

Os aditivos testados foram divididos em grupos dos antimicrobianos (A), acidulantes (C), antioxidantes (O), polímeros (P), sais (S), açúcares (U), proteína (T1), álcool (T2) e quelante (T3). Os aditivos e suas respectivas concentrações testadas estão presentes na TABELA 22. Os aditivos foram testados na concentração mínima permitida pela legislação brasileira (Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988, Aditivos Intencionais)

bem como de acordo com suas características e propriedades indicadas por Rowe (2009). A amostra denominada CONTROLE refere-se ao extrato enzimático concentrado (micro e ultrafiltrado) sem adição de aditivos, conforme preparado no subitem 2.7.2 e 2.7.3.3 do capítulo V.

Os aditivos selecionados para a etapa subsequente foram aqueles que mantiveram $\geq 70\%$ de atividade relativa de fitase conduzida a 50°C / 30 min durante a reação enzimática. Posteriormente, realizou-se a determinação da atividade fitásica (item 2.4).

TABELA 22 - ESTUDO PRELIMINAR DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CLASSES DE ADITIVOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA EM TEMPERATURA DE 50°C POR 30 MINUTOS

Classe do Aditivo	Aditivo	Concentração
Antimicrobianos	A1	0,01%
	A2	0,015%
	A3	0,02%
	A4	0,1%
Acidulantes	C1	0,3%
	C2	0,1%
Antioxidantes	O1	0,01%
	O2	0,01%
Polímeros	P1	0,1%
	P2	0,2%
Sais	S1	5%
	S2	5%
	S3	0,3%
	S4	100 mM
Proteína	T1	0,5%
Álcool	T2	10%
Quelante	T3	1mM
Açúcares	U1	5%
	U2	20%
	U3	5%
	U4	5%

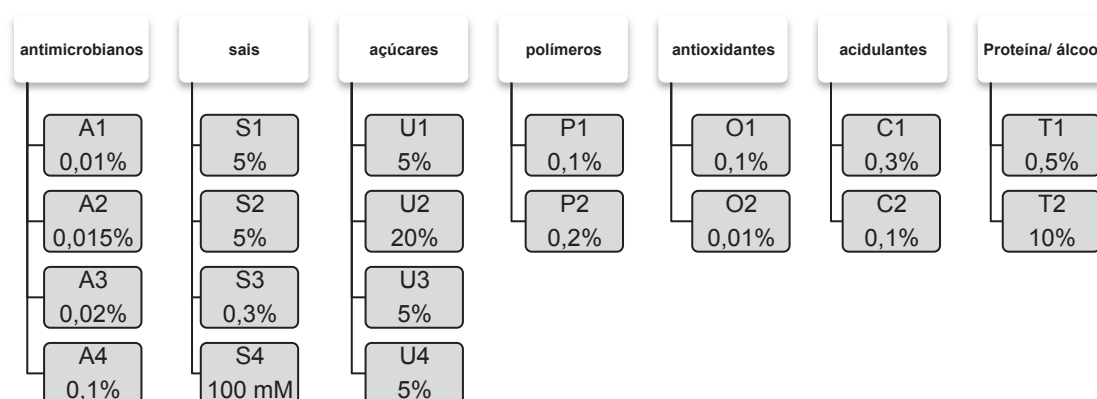
2.5.4 Segunda etapa: Seleção dos aditivos para formulação líquida

A segunda etapa consistiu avaliar a influência dos aditivos, selecionados previamente na primeira etapa, na estabilidade da atividade da fitase na forma líquida em condições aceleradas. Os aditivos estudados pertencem às classes de antimicrobianos, estabilizantes (sais e açúcares), polímeros, antioxidantes, acidulantes, proteína e álcool (FIGURA 25) conforme classificação dos aditivos alimentares (Portaria n. 540, SVS/MS de 27/10/1997). Os aditivos foram testados isoladamente no concentrado

enzimático para avaliar a influência durante o armazenamento acelerado (subitem 2.4).

Cada formulação continha o extrato enzimático concentrado, o aditivo selecionado e foram conduzidos conforme o preparo das amostras do subitem 2.3. As atividades enzimáticas de fitase foram determinadas conforme o subitem 2.4 nos tempos 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias de armazenamento à 40 ± 2 °C. Os valores obtidos das atividades enzimáticas foram comparadas à atividade da amostra CONTROLE (subitem 2.3).

FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CODIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE ADITIVOS ANTIMICROBIANOS, ESTABILIZANTES (SAIS E AÇÚCARES), POLÍMEROS, ANTIOXIDANTES, ACIDULANTES E PROTEÍNA / ÁLCOOL



2.5.5 Terceira etapa: estudo da combinação de aditivos (A1, C2, U3, T1, T2, O2 e S1) na formulação líquida

A terceira etapa do estudo consistiu na avaliação da presença e ausência dos aditivos selecionados previamente. O delineamento Plackett-Burman *Screening Design* (PB) 11/12 foi proposto com 7 fatores ou variáveis independentes (aditivos) e 4 *dummies* (variáveis falsas), totalizando 12 experimentos. A variável dependente (resposta) avaliada foi atividade relativa de fitase. Dois níveis foram utilizados: (+1) presença do aditivo e (-1) ausência do aditivo. Os níveis codificados encontram-se na TABELA 23. Tanto o delineamento quanto a análise dos resultados foram realizados no *software* STATISTICA 5.0 (StatSoft Inc., USA). Os 12 experimentos consistiram de amostra de volume 10 mL contendo a concentração final dos aditivos conforme concentrações e combinações mostradas nas TABELAS 23 e 24. As

formulações líquidas foram acondicionadas conforme descrito no subitem 2.3 deste capítulo. As atividades de fitase foram determinadas em todos os experimentos (subitem 2.4) e análise estatística após os 15 dias do armazenamento acelerado.

TABELA 23 - FATORES E NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS USADOS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN *SCREENING DESIGN* 11/12 PARA A AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS ADITIVOS NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40 °C

Classe	Variáveis (Aditivos)	Níveis	
		-1	+1
Antimicrobiano	A1	0	0,01%
Acidulante	C2	0	0,1%
Açúcar	U3	0	5%
Proteína	T1	0	0,5%
Álcool	T2	0	10%
Antioxidante	O2	0	0,01%
Sal	S1	0	5%

TABELA 24 - MATRIZ DO PLACKETT-BURMAN *SCREENING DESIGN* 11/12 PARA ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS ADITIVOS NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA

Form.	Variáveis										
	A1	C2	U3	T1	T2	O2	S1	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
1	1(0,01%)	-1(0)	1(5%)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	1(5%)	1	1	-1	1
2	1(0,01%)	1(0,1%)	-1(0)	1(0,5%)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	1	1	1	-1
3	-1(0)	1(0,1%)	1(5%)	-1(0)	1(10%)	-1(0)	-1(0)	-1	1	1	1
4	1(0,01%)	-1(0)	1(5%)	1(0,5%)	-1(0)	1(0,01%)	-1(0)	-1	-1	1	1
5	1(0,01%)	1(0,1%)	-1(0)	1(0,5%)	1(10%)	-1(0)	1(5%)	-1	-1	-1	1
6	1(0,01%)	1(0,1%)	1(5%)	-1(0)	1(10%)	1(0,01%)	-1(0)	1	-1	-1	-1
7	-1(0)	1(0,1%)	1(5%)	1(0,5%)	-1(0)	1(0,01%)	1(5%)	-1	1	-1	-1
8	-1(0)	-1(0)	1(5%)	1(0,5%)	1(10%)	-1(0)	1(5%)	1	-1	1	-1
9	-1(0)	-1(0)	-1(0)	1(0,5%)	1(10%)	1(0,01%)	-1(0)	1	1	-1	1
10	1(0,01%)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	1(10%)	1(0,01%)	1(5%)	-1	1	1	-1
11	-1(0)	1(0,1%)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	1(0,01%)	1(5%)	1	-1	1	1
12	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	-1	-1	-1	-1

D₁, D₂, D₃ e D₄ são variáveis *dummies*.

2.5.6 Quarta etapa: Definição da concentração dos aditivos selecionados A1, O2 e S1 na formulação da fitase na forma líquida

Para determinar as concentrações dos aditivos significativos da terceira etapa, aplicou-se o delineamento experimental tipo DCCR com três variáveis,

dois níveis, seis pontos axiais e quatro pontos centrais totalizando 18 ensaios. Os níveis codificados e decodificados estão presentes na TABELA 24.

Cada ensaio continha extrato concentrado de fitase (micro e ultrafiltrado) (2.7.2 e 2.7.3.3 do capítulo V) com concentrações finais dos aditivos conforme TABELA 25 compondo 18 formulações (ensaios), em volume final de 10 mL. As 18 formulações foram acondicionadas em frascos de vidro transparentes com 1/3 de *headspace* conforme descrito no subitem 2.3. Os frascos foram submetidos a condição acelerada (subitem 2.5.1). A determinação da atividade da fitase foi realizada em todas as 18 formulações (amostras) após os 15 dias de armazenamento acelerado (subitem 2.4). O *software* STATISTICA 5.0 (StatSoft Inc., USA) foi utilizado para gerar a matriz do delineamento bem como para analisar os resultados.

TABELA 25 - NÍVEIS CODIFICADOS E DECODIFICADOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TIPO DCCR PARA DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS NO CONCENTRADO ENZIMÁTICO

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A1	0	0,21	0,5	0,79	1
O2	0	0,0021	0,005	0,0079	0,01
S1	0	1,02	2,5	3,98	5

2.6 FORMULAÇÃO DA FITASE EM PÓ

Cinco polímeros encapsulantes foram avaliados para o estudo da formulação da fitase em pó: carboidratos (E1 e E2 a 2%), polissacarídeo E3 4%, amido E4 2% e a goma E5 2%. Cada polímero foi testado separadamente. O extrato enzimático concentrado (micro e ultrafiltrado) foi preparado conforme os subitens 2.7.2 e 2.7.3.3 do capítulo V. O polímero encapsulante selecionado foi misturado no extrato enzimático concentrado (micro e ultrafiltrado). Além dos polímeros foi utilizada formulação base composta por um antiumectante, protetor térmico e ativador da enzima. O aditivo conservante A1 0,21% (m/v) e aditivo antioxidante O2 0,0021% (m/v) também foram incluídos na formulação em pó. A atividade enzimática de cada formulação foi determinada antes e após a secagem em *spray dryer*, conforme o subitem 2.4.

2.6.1 Secagem em *Spray Dryer*

A secagem das cinco formulações (misturas líquidas) foi conduzida no secador por atomização *spray drying* escala laboratorial *Spray Dryer* Lab Plant, modelo SD-05 (Huddersfield, U.K.) com câmara de secagem de 210 mm de diâmetro e 350 mm de altura. As condições operacionais foram: bico injetor de 0,5 mm de diâmetro, fluxo de ar de $52 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, pressão do ar de 0,6 bar e vazão de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de entrada do ar $150 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de saída $75 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. As condições de secagem foram mantidas para todas as cinco operações. A amostra foi alimentada no *spray dryer* com auxílio de uma bomba peristáltica, a qual atingiu o bico atomizador, pulverizando-a na câmara de secagem. As partículas úmidas em contato com o ar quente e seco perdem umidade formando partículas em pó, o qual foi coletado, acondicionado em recipiente plástico para posterior análises. Não foram realizados estudos de embalagem para o armazenamento da fitase em pó.

2.6.2 Análises das formulações em pó

2.6.2.1 Análise de umidade das formulações em pó

A balança analisadora de umidade i-Thermo (Bel *Engineering*, Princeton, USA) foi utilizada para a determinação de umidade das amostras formuladas em pó. A umidade foi determinada imediatamente após a secagem no *spray dryer* e após 15 dias de armazenamento.

2.6.2.2 Rendimento das formulações de fitase em pó obtidas por secagem em *spray dryer*

Cada uma das amostras da formulação de fitase em pó foi pesada em balança analítica e determinada a atividade enzimática (subitem 2.4). O rendimento do processo foi calculado com base nos dados da pesagem antes e depois da operação no *spray dryer*.

2.6.2.3 Análise da Estabilidade da Atividade Enzimática nas Formulações em pó

As amostras formuladas em pó foram submetidas a determinação da atividade enzimática remanescente durante o processo e armazenamento em estufa a 40°C durante 0, 7 e 15 dias. A estufa utilizada não tinha controle de

umidade relativa, somente controle de temperatura. As análises enzimáticas nos estudos de estabilidade em temperatura ambiente (25 ± 5 °C) realizou-se o ensaio da fitase (subitem 2.4) nas amostras durante 0, 30, 60 e 90 dias.

2.6.2.4 Análise das formulações de fitase em pó em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As cinco formulações em pó foram observadas por MEV, utilizando o microscópio Vega 3 Tescan (Brno, República Tcheca). As amostras foram previamente fixadas em suporte *stub* coberta com fita dupla face de carbono. Estas foram revestidas com ouro sob uma atmosfera de argônio, utilizando um equipamento metalizador Balzers SCD 030 (Schaumburg, EUA) com pressão 0,1 bar à vácuo e corrente elétrica 30 mA. As fotomicrografias foram efetuadas a uma voltagem de aceleração de 15,0 kV e aumentos de 350, 1000, 3000 e 7000 vezes. As características do tamanho das partículas, forma, agregação foram analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os ensaios de formulação líquida e em pó foram determinados a atividade inicial (tempo 0) e considerada 100% de atividade relativa de enzima.

3.1 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DA FITASE NA FORMA LÍQUIDA

3.1.1 Primeira etapa: Estudo preliminar da influência de diferentes aditivos durante a reação enzimática

Os dados mostrados na TABELA 26 referem-se à atividade relativa (%) em relação à atividade enzimática do controle (sem adição de aditivos), definido como 100%. A atividade relativa após o ensaio enzimático permitiu avaliar se os aditivos interferem durante a reação na formação do complexo enzima-substrato.

O melhor aditivo testado neste estudo foi o antimicrobiano A4 a 0,1% (m/v), o qual obteve 97,22% da atividade residual (à 50°C/30 min) comparado com o controle (100%). De acordo com Rowe e colaboradores (2009), o aditivo A4 apresenta propriedades antimicrobianas, amplamente aplicado em

alimentos e produtos farmacêuticos, além de possuir uma ótima solubilidade em diversos solventes e apresenta estabilidade em soluções aquosas. Esse mesmo aditivo está presente na formulação da fitase comercial Ronozyme® P líquida (DSM, Koninklijke, Holanda) (EFSA, 2010). Do mesmo modo, A4 a 0,1% (m/v) é componente da formulação da fitase comercial Phyzyme XP 10000 L (Danisco, Marlborough, Reino Unido) (EFSA, 2008).

Os aditivos antimicrobiano A2 0,015% (m/v), proteína T1 0,5% (m/v), álcool T2 10% (m/v) e sal S1 5% (m/v) apresentaram atividades relativa superior a 90%. Outros efeitos positivos foram observados nos ensaios com acidulante C2 0,1% (m/v) e o antimicrobiano A3 0,02% (m/v), os quais apresentaram 87% de atividade relativa. Efeitos similares também foram evidenciados com a mesma porcentagem e valores muito próximos de atividade enzimática relativa. Dentre eles, encontram-se o sal S4 100 mM e o antioxidante O1 0,01% (m/v) com 81% de atividade relativa, P2 0,2% (m/v) e U4 5% (m/v) com 79% de atividade relativa. Já o polímero P1 0,1% (m/v), o açúcar U3 5% (m/v) e o antioxidante O2 0,01% (m/v) resultaram em 78,94%, 78,67% e 78,48% de atividade relativa, respectivamente. Observou-se que alguns aditivos demonstraram a mesma porcentagem de atividade residual, porém possuem funções específicas distintas. Apesar disso, conforme Rowe e colaboradores (2009) os aditivos podem apresentar mais de uma propriedade dentro da sua respectiva categoria/ classe. É o caso do aditivo utilizado C2, que apresenta propriedade antioxidante, acidulante, tamponante, quelante e conservante.

Conforme EFSA (2008), as fitases comerciais para aplicação em ração animal apresentam variados aditivos empregados na composição de suas formulações. No produto Natuphos® 10000L (BASF, Alemanha) possui na sua formulação o T2 (25%) e o U2 (20%) (EFSA, 2006). Outra fitase comercial é a Optiphos® L 8000 (Huvepharma®, Bulgária) (EFSA, 2011) que apresenta o açúcar U3 (30%) e o antimicrobiano A3 (0,5%) como componentes da formulação. Da mesma forma, a Quantum™ Phytase 5000L (AB Vista, Reino Unido) possui dois ingredientes na formulação, um acidulante U2 e um sal S2 (EFSA, 2008).

O aditivo quelante T3 a 1mM não foi selecionado para a etapa seguinte, pois apresentou somente 67,03% de atividade em relação ao controle, ou

seja, atividade relativa < 70% do critério proposto neste estudo. Por conseguinte, para a segunda etapa foram selecionados todos os aditivos com exceção do aditivo T3.

TABELA 26 - INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS SOBRE A ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA À 50 °C POR 30 MINUTOS

Classe do Aditivo	Aditivo	Concentração	Atividade relativa de fitase (%)
Controle	-	-	100 ± 3,51
Antimicrobianos	A1	0,01%	76,45 ± 1,04
	A2	0,015%	95,84 ± 7,42
	A3	0,02%	87,81 ± 0,49
	A4	0,1%	97,22 ± 1,21
Acidulantes	C1	0,3%	75,34 ± 4,22
	C2	0,1%	87,53 ± 1,80
Antioxidantes	O1	0,01%	81,97 ± 2,90
	O2	0,01%	78,48 ± 5,53
Polímeros	P1	0,1%	78,94 ± 0,51
	P2	0,2%	79,22 ± 2,02
Sais	S1	5%	90,30 ± 6,10
	S2	5%	83,10 ± 0
	S3	0,3%	84,21 ± 0
	S4	100 mM	81,44 ± 3,82
Proteína	T1	0,5%	93,62 ± 0
Álcool	T2	10%	91,22 ± 5,25
Quelante	T3	1mM	67,03 ± 6,06
Açúcares	U1	5%	85,04 ± 0,54
	U2	20%	77,56 ± 0
	U3	5%	78,67 ± 0,52
	U4	5%	79,03 ± 6,07

3.1.2 Segunda etapa: Seleção dos aditivos para formulação líquida

Os resultados do efeito da adição dos aditivos na estabilidade da atividade enzimática em condição acelerada estão apresentados na FIGURA 26. O experimento CONTROLE (amostra sem aditivo) apresentou atividade residual de 60,58% após os 15 dias de armazenamento.

A discussão desta etapa foi realizada pela divisão dos aditivos em grupos para o melhor entendimento. A presença dos aditivos antimicrobianos A1, A4 e A3 resultaram em 100% de atividade relativa, ou seja, em 15 dias de estudo em condições aceleradas não houveram perdas relacionadas à atividade de fitase. O A2 foi o qual apresentou uma perda de 9,82% em relação a sua atividade inicial.

Dentre os sais estudados, o sal S1 apresentou melhor resultado, o qual ativou a enzima após 15 dias (106% de atividade relativa). Em segundo lugar,

o sal S3 resultou em 87,52% de atividade residual. Em seguida o sal S2, resultando em 78,37% de atividade residual comparado ao tempo inicial. Por último, o aditivo S4 perdeu 38,65% da atividade de fitase durante o armazenamento acelerado. Kohn e colaboradores (1997) e Wang (1999) evidenciaram que o efeito dos sais na estabilidade de proteínas é complexa devido às interações iônicas. Da mesma forma, os sais podem estabilizar, desestabilizar, ou não apresentar efeitos sobre a estabilidade da proteína, dependendo do tipo e concentração. Outra possibilidade é de que os sais podem aumentar a tensão superficial na interface de água e proteína fortalecendo a interação hidrofóbica (KRISTJÁNSSON e KINSELLA, 1991; KOHN et al., 1997; WANG, 1999).

O açúcar U2 apresentou maior perda (47,8%) de atividade de fitase quando comparando com o controle (perda de 39,42%) após 15 dias. O açúcar U3 manteve 100% da atividade de fitase após 15 dias de armazenamento à 40°C. Os açúcares U1 e U4 resultaram em perdas de 17,05% e 15,63% respectivamente.

Dentre os polímeros testados, o polímero P2 apresentou 10,84% de perdas na atividade enzimática em 15 dias de armazenamento. Porém durante o 5° e 11° dia de estudo observou-se uma ativação da enzima, 113,28% e 110% respectivamente. O polímero P1 apresentou queda de 15,9% de atividade relativa após 15 dias de estudo. Iyer e Ananthanarayan (2008) ressaltaram que a adição de açúcares e polióis em soluções aquosas de enzima podem fortalecer as interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos não-polares, que conduzem a rigidificação da proteína bem como a resistência térmica. Farruggia e colaboradores (1997) relataram que os PEGs são frequentemente utilizados como crioprotetores proteína ou também como agentes de precipitação e cristalização em meios aquosos. Eles possuem natureza hidrofóbica, por este motivo, podem interagir com as cadeias laterais hidrofóbicas das proteínas, promovendo o desdobramento proteico. Assim, os açúcares e polímeros testados neste estudo, possivelmente condizem com essas reações explicadas na estabilidade enzimática.

No grupo dos antioxidantes, o O2 apresentou uma leve queda de 12% em 24 horas de armazenamento, porém no restante do tempo de

armazenamento a atividade da enzima se manteve estável com leve ativação em 15 dias (108,35%). O efeito do antioxidante O1 resultou em uma perda de 10% de atividade relativa no mesmo período.

Jason e Morrow (2000) citou que a oxidação das enzimas pode acarretar mudanças na estrutura da proteína bem como danos na ação catalítica. Os aminoácidos mais propensos à oxidação são a cisteína e a metionina. No caso da cisteína, ocorre a reação com tióis livres para formação de sulfetos. Em relação a metionina, a oxidação leva a formação da metionina sulfóxido. Outros aminoácidos podem necessitar de condições mais rigorosas para a modificação oxidativa. Portanto, provavelmente os antioxidantes testados no presente estudo evitaram a oxidação da fitase.

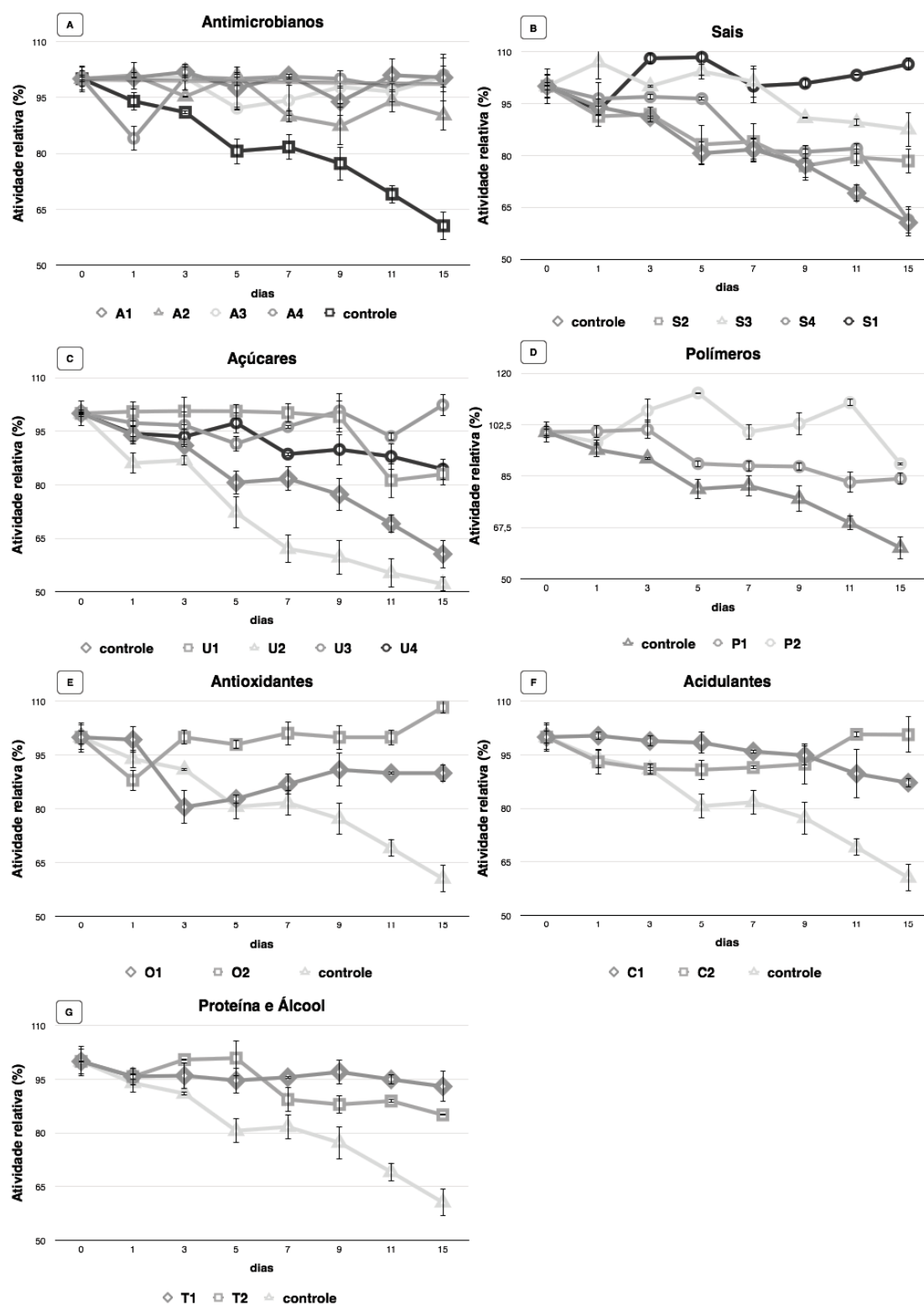
O acidulante C2 apresentou efeito positivo na estabilidade da enzima, não houve perdas de atividade de fitase no final do teste. Um resultado satisfatório também foi obtido com a adição do acidulante C1 que apresentou uma perda de 12,81% de atividade da enzima.

Em comparação, Batista (2014) desenvolveu uma formulação líquida de dextranase produzida por *Penicillium aculeatum*. A partir de delineamentos experimentais, os aditivos selecionados foram o ácido cítrico a 0,17% (m/v) e o sorbitol 2,83% que estabilizaram a enzima durante o estudo de armazenamento.

No presente estudo empregou-se o proteína T1 e o álcool T2 no concentrado enzimático, os quais também apresentaram bons resultados, 7% e 15% respectivamente de perdas da atividade da fitase.

Para estudos posteriores foram selecionados um aditivo de cada grupo foram escolhidos, os aditivos antimicrobiano A1 (100%), sal S1 (106%), açúcar U3 (100%), antioxidante O2 (82%), acidulante C2 (100%), proteína T1 (93%) e álcool T2 (85%), pois apresentaram efeitos positivos na estabilidade da atividade da enzima armazenada à 40°C por 15 dias.

FIGURA 26 - ESTUDO DOS ADITIVOS NO CONCENTRADO ENZIMÁTICO ARMAZENADO À 40 °C POR 15 DIAS. A - ANTIMICROBIANOS; B - SAIS; C - AÇÚCARES; D - POLÍMEROS; E - ANTIOXIDANTES; F - ACIDULANTES; G - PROTEÍNA E O ÁLCOOL



3.1.3 Terceira etapa: estudo da combinação de aditivos (A1, C2, U3, T1, T2, O2 e S1) na formulação líquida

Os seguintes aditivos foram selecionados para a presente etapa: A1, S1, U3, O2, C2, T1 e T2 utilizando o delineamento Plackett-Burman *design* 11/12. A TABELA 27 apresenta os resultados das atividades relativas (variável dependente ou resposta). Conforme a análise de variância, os resultados do Plackett-Burman mostraram um R^2 de 0,93. A presença das variáveis (aditivos) significativas o antimicrobiano A1 ($p < 0,009$), o antioxidante O2 ($p < 0,006$) e o sal S1 ($p < 0,049$) apresentaram importância na estabilidade da atividade da fitase conforme mostra o Diagrama de Pareto (FIGURA 27). Os demais aditivos não apresentaram significância de 95%. O antioxidante O2 foi o qual apresentou maior significância estatística ($p < 0,006$), o qual exerceu um efeito estimado negativo (-4,66). Este resultado indicou que a estabilidade da enzima pode ser atingida com o uso de concentrações reduzidas ($< 0,01\%$) desse aditivo. O sal S1 também apresentou efeito negativo (-2,74), sugere-se menor a concentração deste sal ($< 5\%$) na formulação líquida da fitase.

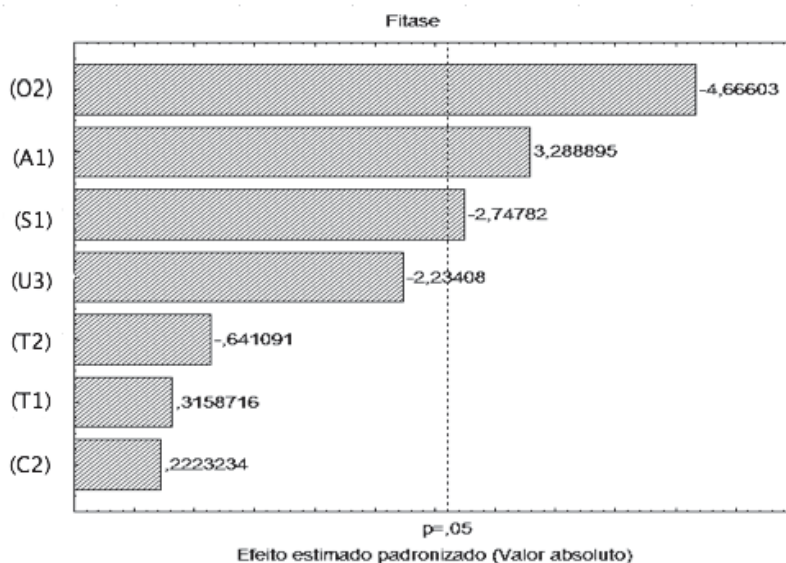
As formulações de número dois (A1, C2 e T1) e cinco (A1, C2, T1, T2, S1) apresentaram resultados positivos de ativação da enzima durante o estudo acelerado, atingindo valores de 113,26% e 103,59% de atividade relativa, respectivamente. Em contrapartida, as formulações sete (C2, U3, T1, O2 E S1) e onze (C2, O2 E S1) apresentaram o mesmo valor de 67,96% de atividade relativa e menores em relação as demais formulações.

Portanto, somente as variáveis significativas ($p < 0,05$) o antimicrobiano A1, antioxidante O2 e o sal S1 foram selecionadas para a quarta etapa do estudo de formulação de fitase na forma líquida.

TABELA 27 - FORMULAÇÕES COM AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS DO PLANEJAMENTO PB

Formulações	Variáveis independentes					Variável dependente (resposta) Atividade relativa (%)
1	A1	U3	S1			95,86
2	A1	C2	T1			113,26
3	C2	U3	T2			83,43
4	A1	U3	T1	O2		81,77
5	A1	C2	T1	T2	S1	103,59
6	A1	C2	U3	T2	O2	90,33
7	C2	U3	T1	O2	S1	67,96
8	U3	T1	T2	S1		78,18
9	T1	T2	O2			82,87
10	A1	T2	O2	S1		77,90
11	C2	O2	S1			67,96
12	controle					93,14

FIGURA 27 - DIAGRAMA DE PARETO COM OS EFEITOS DOS ADITIVOS PRINCIPAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA



3.1.4 Quarta etapa: definição da concentração dos aditivos A1, O2 e S1 na formulação líquida

Os resultados do estudo dos aditivos antimicrobiano A1, antioxidante O2 e o sal S1 e suas concentrações encontram-se no delineamento tipo DCCR com 2^3 (dois níveis e três variáveis) (TABELA 28). O objetivo principal deste estudo foi definir a concentração dos aditivos significativos estatisticamente na forma líquida da fitase. O modelo obtido apresentou ajuste satisfatório aos

dados experimentais (R^2 0,87). As variáveis significativas foram os aditivos A1 ($p < 0,05$) e O2 ($p < 0,01$), ou seja, apresentaram influência na atividade da fitase em condições aceleradas em 15 dias. A variável S1 não foi significativa ($p > 0,05$) nesse experimento. A interação A1 e S1 ($p < 0,003$) (-2,16) também apresentou significância de 95%.

A atividade do CONTROLE (sem aditivos) foi 23,4 U mL⁻¹ de atividade de fitase após os 15 dias à 40°C. As respostas (variáveis) dependentes das atividades enzimáticas variaram entre 17,6 a 28 U mL⁻¹ (atividade após 15 dias à 40 °C). O maior resultado foi obtido na formulação 2 (A1 0,21%, O2 0,0021% e S1 3,98%) com atividade de fitase 28 U mL⁻¹. Resultados similares foram observados na formulação 15 (A1 0,5%, O2 0,005% e S1 2,5%) e 17 (A1 0,5%, O2 0,005% e S1 2,5%), também denominados pontos centrais com 26,3 U mL⁻¹ e 26,2 U mL⁻¹ de atividade de fitase respectivamente. A menor atividade de fitase (17,6 U mL⁻¹) foi obtida na formulação 8 (A1 0,79%, O2 0,0079% e S1 3,8%).

Conforme a superfície de resposta apresentada (FIGURA 28), a região ótima foi alcançada nas formulações contendo o antimicrobiano A1 a 0,21% e o antioxidante O2 a 0,0021%. Portanto, a formulação da fitase na forma líquida contém A1 0,21% e o O2 0,0021%. Ressalta-se que o aditivo sal S1 não foi considerado para a construção da superfície de resposta (A1 *versus* O2) pois não apresentou significância estatística ($p < 0,05$).

O modelo polinomial geral que considera em seus termos a presença dos aditivos A1, O2 e S1 bem como suas interações na composição da formulação de fitase na forma líquida encontra-se abaixo:

$$Y = 25,76 - 1,29A^* - (1,56)A^{2*} - 1,32B^* - (0,57)B^2 - 0,16C - (0,62)C^2 + 0,087AB - 2,16AC^* + 0,76BC$$

EQUAÇÃO 12

Onde: Y = atividade da fitase, U mL⁻¹; A = A1, %; B = O2, %; C = S1, %.

*termo com efeito significativo ($p < 0,05$).

Esses dados corroboram com os encontrados por Nielsen e colaboradores (2007), patente que contempla uma composição líquida enzimática contendo o mesmo antimicrobiano A1 da formulação desenvolvida neste presente trabalho. Em outra patente pesquisada também foi encontrada

a adição do mesmo aditivo (A1) que apresenta função estabilizadora da atividade de enzimas em agentes de limpeza (MICHELS et al., 2011).

Em relação ao agente antioxidante, um efeito similar foi encontrado por Rommele e Hagemann (1978) que utilizaram o mesmo aditivo antioxidante (O2) em uma formulação aquosa de papaína. A patente de Whitehurst e Green (2010) descrevem o uso do mesmo aditivo O2 em uma formulação líquida contendo hemicelulases para aplicação em massas (macarrão).

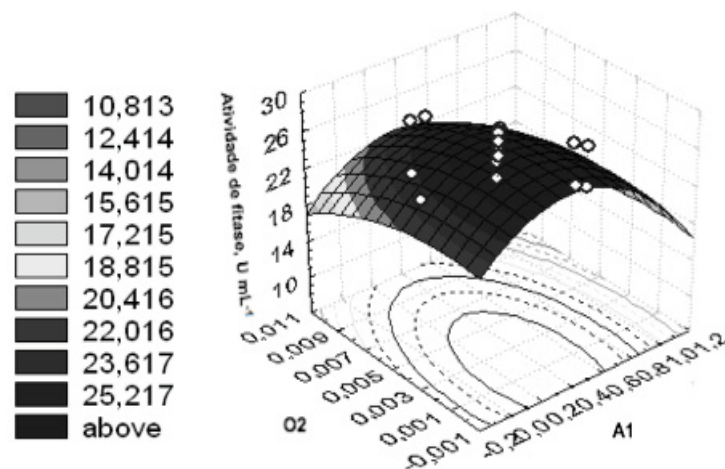
Portanto, os experimentos de otimização em sua totalidade propiciaram uma combinação e determinação da concentração dos aditivos selecionados para a formulação líquida da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56.

TABELA 28 - RESULTADOS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PELO DELINEAMENTO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS A1, O2 e S1 NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE

Formulações	Variáveis dependentes			Variável dependente
	A1 (%)	O2 (%)	S1 (%)	Atividade de fitase (U mL ⁻¹)
1	0,21	0,0021	1,02	26
2	0,21	0,0021	3,98	28
3	0,21	0,0079	1,02	20
4	0,21	0,0079	3,98	26,6
5	0,79	0,0021	1,02	25,3
6	0,79	0,0021	3,98	20,2
7	0,79	0,0079	1,02	21,2
8	0,79	0,0079	3,98	17,6
9	0	0,005	2,5	21,6
10	1	0,005	2,5	20,8
11	0,5	0	2,5	25,2
12	0,5	0,01	2,5	22,8
13	0,5	0,005	0	24,5
14	0,5	0,005	5	23,2
15 (PC)	0,5	0,005	2,5	26,3
16 (PC)	0,5	0,005	2,5	25,6
17 (PC)	0,5	0,005	2,5	26,2
18 (PC)	0,5	0,005	2,5	25,0

PC: ponto central

FIGURA 28 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ADITIVOS A1, O2 e S1 NA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA FITASE APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40 °C



3.1.5 Estudo da estabilidade da atividade fitásica na formulação líquida em condições aceleradas

Após 15 dias de armazenamento à 40°C, os aditivos A1 0,21% e O2 0,0021% obtiveram excelentes resultados, 103,5% de estabilidade da fitase.

3.2 FORMULAÇÃO DA FITASE EM PÓ

3.2.1 Secagem em *Spray Dryer*

Dentre os polímeros testados, o E2 apresentou melhor resultado (120,72% de atividade relativa de fitase) após a secagem em *spray dryer* em relação ao valor da atividade inicial de fitase antes da secagem. Sugere-se que a formulação contendo o encapsulante E2, o ativador da enzima e o protetor térmico proporcionou um estímulo da fitase, devido a interação entre os componentes da fórmula. A TABELA 29 apresenta os resultados dos testes de secagem da fitase em *spray dryer*. O polímero E1 também mostrou adequado como encapsulante para a secagem da enzima por *spray dryer*, com atividade relativa de fitase de 99,88%. Os polímeros E4 e E5 apresentaram uma perda de atividade de 19,90% e 15,83%, respectivamente. A presença do polímero E3 na formulação resultou na menor atividade relativa de fitase 33,06% após secagem.

Durante o processo de secagem por atomização, as enzimas podem perder parte de sua atividade devido a sua exposição a altas temperaturas ocasionando estresse térmico e mecânico na câmara de secagem do equipamento. A utilização de polímeros no processo apresenta a função de proteger a molécula contra altas temperaturas (GONÇALVES et al., 2013). Millqvist-Fureby e colaboradores (1999) ressaltaram que os polímeros preservam a estrutura nativa da proteína na ausência de água. Outra razão é de que os polímeros poderiam formar uma matriz cristalina que bloqueia alterações na conformação estrutural proteica, preservando assim sua atividade.

As formulações de fitases comerciais reportadas na literatura, destacaram-se o E4 como agente carreador. Os produtos comerciais que utilizam o mesmo polímero E4 do presente trabalho são Natuphos[®] 5000 (BASF, Alemanha) (EFSA, 2009) e Phyzyme XP 10000 TPT (AB Vista, Reino Unido) (EFSA, 2008). Optiphos[®] G 4000 (Huvepharma[®], Bulgária) também apresenta em sua composição o polímero E4, porém na forma granulada e não em pó como obtida no presente trabalho de pesquisa. Ronozyme[®] P (DSM, Koninklijke, Holanda) na forma granulada também contém na composição de sua formulação em pó os polímeros E3 e o E4 (EFSA, 2010), os quais corroboram com este estudo.

TABELA 29 - RESULTADOS DOS TESTES DE SECAGEM DA FITASE EM *SPRAY DRYER* UTILIZANDO DIFERENTES POLÍMEROS ENCAPSULANTES

Polímeros	Atividade relativa* (%)
E1	99,88
E2	120,74
E3	33,06
E4	80,10
E5	84,17

* Atividade relativa de fitase após a secagem

3.2.2 Análise de Umidade das Formulações em Pó

A amostra formulada contendo o polímero E5 apresentou maior teor de umidade inicial 12% (logo após a secagem) em comparação com as outras formulações. A umidade dessa amostra manteve-se praticamente constante durante o estudo (armazenamento por 15 dias à 40°C). A formulação

contendo E2 apresentou menor umidade inicial 7,61% e, após o armazenamento um aumento de apenas 0,8% de umidade na amostra. A amostra formulada contendo o polímero E4 apresentou 12% de umidade inicial, o qual pode interferir na estabilidade enzimática. A amostra contendo o polímero E3 também obteve o mesmo comportamento, o qual perdeu 1,62% de umidade. O pó contendo o polímero E1 manteve-se com 8,98 a 10,72% de umidade durante todo o estudo. A TABELA 30 apresenta as umidades das amostras em pó. O aumento da umidade das amostras formuladas pode ocasionar a aglomeração do pó e o desenvolvimento de micro-organismos. Porém no presente estudo não foram realizados análises microbiológicas para afirmar se ocorreu algum crescimento microbiano. Utilizando a ferramenta estatística *Tukey's multiple comparisons test* foi demonstrado que nenhuma das amostras formuladas em pó apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

Segundo Tonon e colaboradores (2009) e Rodríguez-Hernández e colaboradores (2005) um elevado teor de umidade não afeta apenas o rendimento do processo, podendo dificultar a coleta do material, mas também compromete a estabilidade microbiológica do produto final. A baixa mobilidade da água contribui para a estabilização durante o armazenamento a longo prazo (BUTINK et al., 2000). A atividade de água e presença de oxigênio são fatores que podem afetar a atividade da enzima.

Dados publicados por Salleh e colaboradores (2014) estão em concordância com os dados do presente estudo, pois as amostras dos autores apresentaram 9,83% de umidade com o uso do polímero E1 a 10% (m/v) após microencapsular a bromelina por secagem em *spray dryer*. Os dados de Sato e colaboradores (2014) também condescendem para a fitase microencapsulada com o polímero E1 e E4 por atomização, 10,6% e 10,7% de umidade, respectivamente. Contrapondo o presente trabalho, a secagem em *spray dryer* do extrato bruto contendo β -D-frutofurosidase de *F. graminearum* resultou em 6,56% e 7,89% de umidade, para as amostras contendo os polímeros E4 2% e E3 2%, respectivamente. De acordo com a literatura, o polímero E1 é um produto estável, de baixa higroscopicidade, sendo utilizado para manter baixo o nível de umidade em produtos em pó.

Portanto, esse é um dos agentes encapsulantes mais utilizados nos processos de microencapsulação, apresentando efeito antioxidante e de preservação do produto (SHAHIDI e HAN, 1993).

TABELA 30 - RESULTADOS DA UMIDADE DAS AMOSTRAS FORMULADAS EM PÓ CONTENDO OS POLÍMEROS TESTADOS E1, E2, E3, E4 E E5 APÓS A SECAGEM EM *SPRAY DRYER* E APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO À 40°C. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)

Formulações	Umidade (%)	
	0 horas	15 dias à 40°C
E1	8,98 ^a ± 1,28	10,72 ^a ± 0,78
E3	9,81 ^a ± 2,01	8,19 ^a ± 0,25
E4	12 ^a ± 0,76	8,73 ^a ± 1,98
E2	7,61 ^a ± 0,31	8,41 ^a ± 2,10
E5	11,84 ^a ± 1,50	11,52 ^a ± 1,21

3.2.3 Rendimento das formulações de fitase em pó obtidas por secagem em *spray dryer*

Os rendimentos do processo de secagem por *spray dryer* estão apresentados na TABELA 31. Considerando os polímeros testados, a formulação que continha o polímero encapsulante E1 apresentou melhor rendimento (42,49%) no final do processo de secagem por atomização (*spray drying*). O menor rendimento foi obtido na formulação contendo o polímero E3 (15,25%) e perdas de 84,24%. Em contrapartida, Sato e colaboradores (2014) obtiveram somente 6,9% de recuperação do processo de secagem em *spray dryer* com o polímero E1 a 2% (m/v) da microencapsulação da fitase produzida por *R. microsporus* var. *Microsporus*. Por outro lado, segundo os mesmos autores, também usou o polímero E4 a 2% (m/v) e obteve um melhor rendimento (53,6%). Portanto, os resultados de Sato e colaboradores (2014) foram menores em relação aos rendimentos obtidos com os polímeros E1 e E4 do presente trabalho.

Os resultados da recuperação da enzima corroboram com Gonçalves e colaboradores (2013), os quais encapsularam a enzima β -D-frutofurosidase de *F. graminearum* utilizando o polímero E4 2% (m/v), obtendo 38,12% de rendimento após a secagem em *spray dryer* do extrato bruto. O mesmo autor

também encontrou um baixo rendimento de 22,42% utilizando o polímero E3 2% (m/v).

Contrapondo o presente trabalho, Salleh e colaboradores (2014) obtiveram 89% de rendimento após o processo de secagem em *spray dryer* quando utilizaram o polímero E1 a 10% (m/v) para microencapsular a enzima bromelina.

Neste estudo pode-se visualizar baixos rendimentos, menos que 50% de recuperação do pó inicial. Todos os agentes encapsulantes testados conferiram ao pó formado as aderências às paredes da câmara de secagem e no ciclone do equipamento. Portanto, uma razão provável para este baixo rendimento, pode ser uma ineficácia obtenção do pó durante o processo de secagem por *spray dryer*.

TABELA 31 - RENDIMENTOS DO PROCESSO DE SECAGEM EM *SPRAY DRYER* DAS FORMULAÇÕES DE FITASE EM PÓ

Polímeros	Rendimento (%)	Perdas (%)
E1	42,49	57,51
E2	28,04	71,96
E3	15,25	84,75
E4	36,76	63,24
E5	31,14	68,86

3.2.4 Análise das formulações de fitase em pó em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A análise do produto formulado em pó utilizando MEV permitiu visualizar o tamanho (em μm) e o aspecto das partículas de cada amostra com uma resolução elevada de aumentos de 350, 1000, 3000 e 7000 vezes. O diâmetro das partículas das 5 formulações apresentaram pequena variação entre as amostras, os quais variaram de 1,54 a 16,88 μm . Desta forma podemos denominar as partículas das amostras de micropartículas, ou microesferas, visto que apresentaram formato esférico. A média de tamanho das microesferas de fitase encapsuladas com o polímero E5 foram maiores (8,46 μm) e com estabilidade em condição acelerada (11,92% de atividade residual) do produto em pó. As obtidas com o polímero E3 a estabilidade foi maior com o produto em pó (30,45%), porém com partículas menores (5,83 μm). As

micrografias eletrônicas das amostras formuladas com os polímeros E1, E2, E3, E4 e E5 estão apresentadas nas FIGURAS 29, 30, 31, 32 e 33, respectivamente. Segundo Trindade e Grosso (2003), comercialmente, as microcápsulas têm tipicamente um diâmetro entre 5 a 500 μm . Deste modo, o tamanho das micropartículas obtidas nesse estudo encontram-se na faixa média padrão dos produtos comerciais.

De um modo geral, as microcápsulas apresentaram forma esférica, sendo características das partículas produzidas pelo processo de secagem por atomização (*spray drying*). As superfícies foram predominantemente rugosas, embora algumas tenham apresentado superfície lisa. A formulação contendo o polímero E2 foi a que apresentou maior rugosidade nas esferas com média de tamanho 7,07 μm e menor estabilidade em condição acelerada (2,79 % de atividade relativa) após 15 dias à 40°C. O polímero E3 obteve uma superfície mais lisa das partículas e com tamanho médio de 7,66 μm e sua estabilidade maior (30,75% de atividade relativa) em 15 dias à 40°C comparando com o polímero E2. Uma hipótese seria que as depressões formadas na superfície das microesferas são devido à contração das partículas durante a secagem e o resfriamento (THIES, 1995). Além disso, essas depressões superficiais podem estar relacionadas com a função da natureza do agente encapsulante testado (TONON et al., 2009).

FIGURA 29 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROPARTÍCULAS DA FORMULAÇÃO CONTENDO O POLÍMERO E1: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES

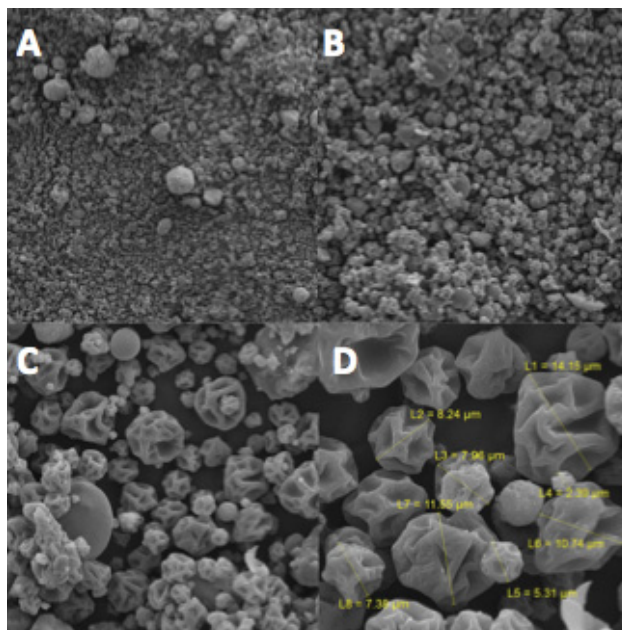


FIGURA 30 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E2: A- AUMENTO 350 VEZES; B- AUMENTO DE 1000 VEZES; C- AUMENTO DE 3000 VEZES; D- AUMENTO DE 7000 VEZES

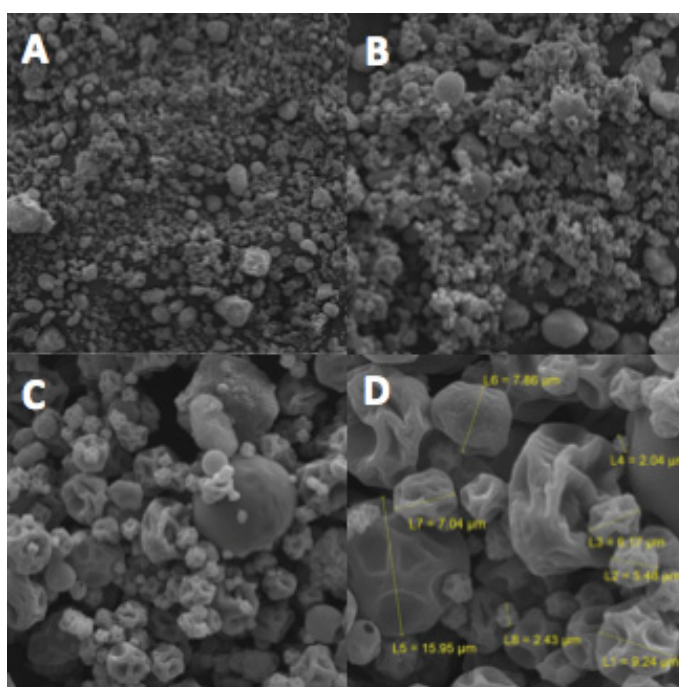


FIGURA 31 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E3: A- AUMENTO 350 VEZES; B- AUMENTO DE 1000 VEZES; C- AUMENTO DE 3000 VEZES; D- AUMENTO DE 7000 VEZES

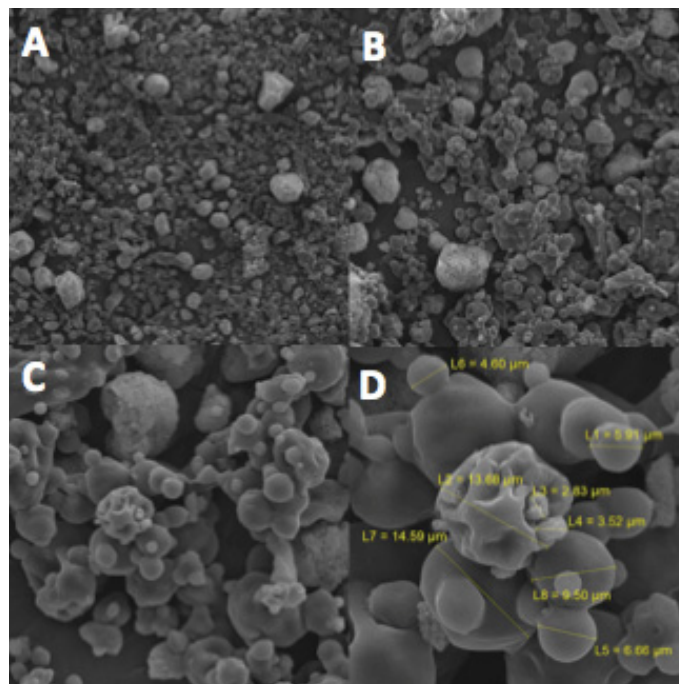


FIGURA 32 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E4: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES

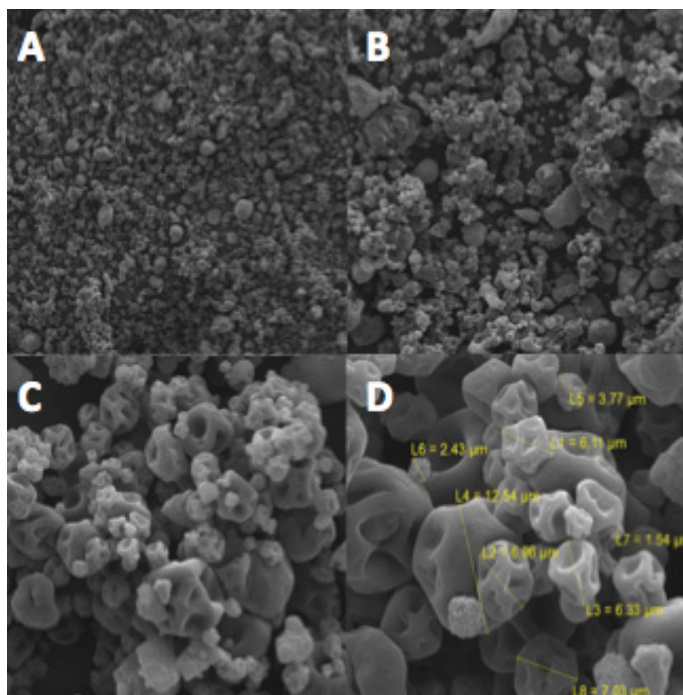
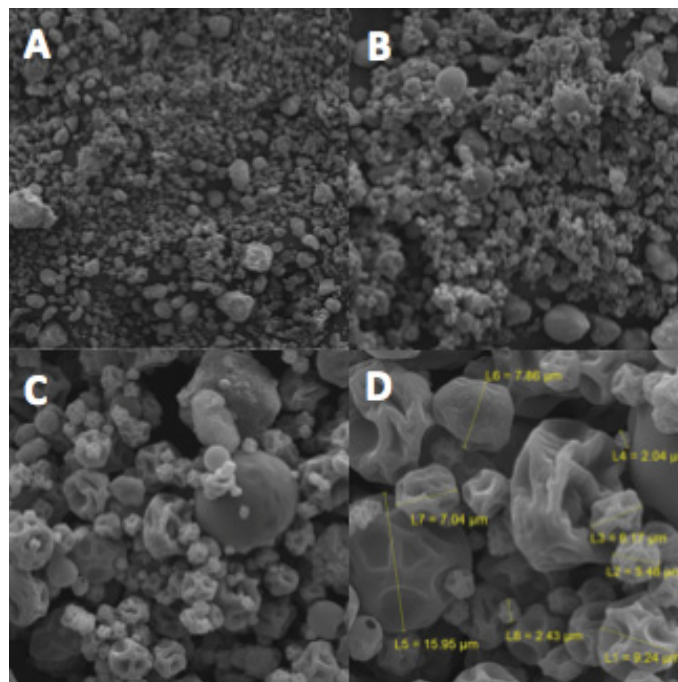


FIGURA 33 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICA DAS MICROESFERAS COM E5: A - AUMENTO 350 VEZES; B - AUMENTO DE 1000 VEZES; C - AUMENTO DE 3000 VEZES; D - AUMENTO DE 7000 VEZES



3.2.5 Estabilidade das amostras formuladas em pó em condições aceleradas

A TABELA 32 apresenta os resultados da estabilidade das formulações em pó armazenadas a temperatura de 40°C durante 15 dias. Analisando os dados, observou-se que a formulação contendo o polímero E1 apresentou maior estabilidade da atividade da fitase, pois reteve 56% da sua atividade relativa após o armazenamento quando comparado com a atividade logo após o processo de secagem. O polímero E2 apresentou a maior perda de 97,21% durante os 15 dias de armazenamento. A formulação contendo o polímero E5 também apresentou uma grande perda da atividade da fitase, resultando somente 11,92% de atividade relativa no final do estudo. Em 7 dias de armazenamento, o polímero E4 obteve 62% da atividade da enzima, porém no final do estudo resultou em 23,47% de atividade relativa. A formulação contendo o polímero E3 reteve 38% da atividade residual no sétimo dia de estudo da estabilidade, e praticamente manteve-se estável no final dos 15 dias, com 30% de atividade residual. A ferramenta estatística *Tukey's multiple comparisons test* apresentou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)

entre as atividades relativas de fitase em pó durante os 15 dias de armazenamento entre os polímeros testados, exceto o E3 *versus* E4.

De acordo com relatos de Ré (1998), as micropartículas provenientes do processo de atomização por *spray dryer* são uma mistura entre a substância ativa e os polímeros. Desse maneira, pode existir enzimas tanto na superfície quanto no interior de cada partícula. Assim, as enzimas da superfície podem perder sua ação catalítica quando entram em contato com um ambiente em condições diferentes ou extremas das condições ideais para a sua estabilidade, enquanto as enzimas localizadas no interior da partícula foram preservadas.

A presença de proteínas na superfície das amostras formuladas em pó contendo diferentes polímeros produzidos por *spray drying* e sua relação com a atividade enzimática remanescente também foi apontada por Millqvist-Fureby e colaboradores (1999) na microencapsulação de tripsina com diferentes carboidratos. Magalhães Netto (1997) afirma ainda que a presença de carboidratos de massa molecular mais alta, como o polímero E1, contribui para auxiliar na estabilidade do sistema.

TABELA 32 - ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES EM PÓ CONTENDO DIFERENTES POLÍMEROS POR SECAGEM EM *SPRAY DRYER*, ARMAZENADAS EM CONDIÇÕES ACELERADAS (40°C) DURANTE DE 0, 7 E 15 DIAS. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$) E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)

Polímeros	Atividade relativa de fitase (%)		
	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	7	15
E1	100 \pm 0,3	58,48 \pm 2,8	55,97 ^a \pm 2,2
E2	100 \pm 4,9	14,25 \pm 4,2	2,79 ^b \pm 0,7
E3	100 \pm 4,2	38,36 \pm 6,3	30,45 ^c \pm 1,4
E4	100 \pm 7,6	62,09 \pm 3,4	23,47 ^{c,d} \pm 7,3
E5	100 \pm 0,3	18,58 \pm 6,9	11,92 ^{b,e} \pm 1,5

3.2.6 Estudo da Estabilidade do produto em pó à temperatura ambiente

As formulações das fitases na forma em pó com os polímeros encapsulantes (E1, E2, E3, E4 e E5) foram avaliadas a estabilidade da atividade da fitase durante o armazenamento à temperatura ambiente (26 ± 3 °C) por 0, 30, 60 e 90 dias. A TABELA 33 mostra os resultados da estabilidade das formulações em pó durante o armazenamento à temperatura ambiente (26 ± 3 °C). A maior estabilidade da fitase (79,01% de atividade relativa em relação a formulação inicial) foi obtida na presença do encapsulante E2 após 90 dias de armazenamento. A formulação com o polímero E1 apresentou uma maior estabilidade durante 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente, perdendo somente 9,19% de sua atividade. Após 90 dias, manteve 68,45% de sua atividade inicial. No entanto, o polímero E3 e E4 apresentaram atividades relativas semelhantes 62,38% e 63,17% respectivamente, bem como os menores valores de estabilidade em comparação com os demais polímeros testados à temperatura ambiente no final do estudo.

A análise estatística do *Tukey's multiple comparisons test* mostrou que somente as atividades relativas de fitase em pó do polímero E2 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os demais polímeros testados durante 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Silva (2010) estudou a estabilidade da lipase de *Cercospora kikuchii* utilizando o polímero E1 e E5 em 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente. O autor relatou que a atividade residual da enzima obteve aproximadamente 70% com o polímero E1 e 77% com o polímero E5 em relação a atividade inicial. Portanto, o resultado do polímero E1 corrobora com o presente estudo.

Alloue e colaboradores (2007) avaliaram a estabilidade das formulações em pó de lipases de *Yarrowia lipolytica*, à temperatura ambiente, obtidas por secagem em *spray dryer*. Em 90 dias de estudo observou-se que as enzimas encapsuladas com os polímeros E1 e E5 apresentaram 100% de atividade.

TABELA 33 - ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES EM PÓ ARMAZENADAS À TEMPERATURA AMBIENTE (26 ± 3 °C) DURANTE 0, 30, 60 E 90 DIAS. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$) E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ESTATISTICAMENTE ($p < 0,05$)

Polímeros	Atividade relativa de fitase (%)			
	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
E1	100 \pm 0,34	90,81 \pm 6,32	81,92 \pm 3,64	68,45 ^a \pm 4,59
E2	100 \pm 4,50	90,74 \pm 1,73	83,95 \pm 1,16	79,01 ^b \pm 1,85
E3	100 \pm 1,82	89,03 \pm 2,03	72,88 \pm 1,28	62,38 ^a \pm 2,26
E4	100 \pm 2,13	85,06 \pm 6,30	77,41 \pm 1,17	63,17 ^a \pm 2,03
E5	100 \pm 2,71	84,62 \pm 1,11	68,81 \pm 1,20	67,34 ^a \pm 1,61

4 CONCLUSÃO

Os resultados dos estudos dos aditivos para obtenção da formulação líquida e em pó da fitase foram alcançados. Dentre vários aditivos testados, os aditivos dos grupos antimicrobiano A1 0,21% e antioxidante O2 0,0021% foram os escolhidos e os quais apresentaram significância nos estudos da formulação líquida. Os planejamentos experimentais realizados com análises estatísticas proporcionaram uma melhor avaliação da influência das interações dos aditivos na estabilidade da enzima, bem como na definição das concentrações dos aditivos selecionados. O produto líquido formulado apresentou leve ativação na atividade da enzima (103,5% de atividade relativa) armazenado à 40°C por 15 dias.

As formulações em pó apresentaram resultados distintos com o uso de 5 diferentes polímeros encapsulantes. O polímero encapsulante E1 apresentou melhores resultados de estabilidade em condição acelerada da atividade enzimática. Porém, o estudo de estabilidade à temperatura ambiente o polímero E2 apresentou maior estabilidade após 90 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS

AB enzymes. **AB enzymes acquires quantum phytase feed enzyme business and technology**. Disponível em: www.abenzymes.com. Acessado em 24/10/2014.

AB Vista feed ingredients. **Phytase from AB Vista**. Disponível em: <http://www.abvista.com/products/enzymes>. Acesso em: 24/10/2014.

ADEOLA, O.; BEDFORD, M. R. **Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*)**. British Journal of Nutrition, v. 92, p. 87–94, 2004.

ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. **Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non ruminant animal production**. Journal of Animal Science, v. 89, p. 3189-3218, 2011.

ADEOLA, O. **Phosphorus equivalency value of an *Escherichia coli* phytase in the diets of White Pekin ducks**. Poultry Science, v. 89, p. 1199-1206, 2010.

AEHLE, W. In: Enzymes in industry: production and applications. **Industrial Enzymes**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH. 2007. p. 99-263.

AEHLE, W. In: General production methods. **Enzymes in Industry**. John Wiley & Sons, Netherlands, 2008, p. 57.

AGOSTINI, J.S.; NOGUEIRA, R.B.; IDA, E.I. **Lowering of phytic acid content by enhancement of phytase and acid phosphatase activities during sunflower germination**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 53, n. 4, 2010.

ALLTECH. **Allzyme SSF**. Disponível em: <http://www2.alltech.com/australia/brands/Pages/AllzymeSSF.aspx>. Acesso em: 24 out. 2014.

ALVES, A.; PHILLIPS, A.J.L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. **Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting**. Research in Microbiology, v. 158, p. 112-121, 2007.

ALLOUE, W.A.M.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONART, P. **Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives**. Process Biochemistry, v. 42, p. 1357–1361, 2007.

ANVISA, **Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988 - Aditivos Intencionais**. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em: 08 out. 2014.

ANVISA, **Portaria AVS/MS n. 540, de 27/10/1997**. Aditivos Alimentares. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em: 08 out. 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 54, de 7 de outubro de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral**. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em: 08 out. 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 53, de 7 de outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral**. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em: 08 out. 2014.

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M. C.; ARRUDA, P. C.; SOUSA M. C. **Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, vol. 6, n. 2, p. 58-65, 2006.

AOAC, ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Official and tentative methods of analysis**, 16.ed. AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

AWAD, G. E.; HELAL, M. M.; DANIAL, E.N.; ESAWY, M. A. **Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design**. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 21, v. 1, p. 81-88, 2014.

BADAMCHI, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; ABBASI, S. **Comparison of phytase production by *Aspergillus Ficum* under submerged and solid state fermentation conditions**. Focusing on Modern Food Industry, v. 2, n. 3, 2013.

BAKRI, Y.; MEKAEEL, A.; KOREIH, A. **Influence of agitation speeds and aeration rates on the xylanase activity of *Aspergillus niger* ss7**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.54, n.4, p. 659-664, 2011.

BARRIENTOS, L.; SCOTT, J.J.; MURTHY, P.P. **Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen**. Plant Physiology 106, 1489-1495, 1994.

BASF, **The chemical company**. Disponível em: http://www.natuphos.basf.com/web/global/natuphos/en_GB/impressum. Acesso em: 24 out. 2014.

BATISTA, M.C.T. **Produção de dextranases a partir de bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria**

sucroalcooleira. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2014.

BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD H. **ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases.** BMC Microbiology, v.10, p.189, 2010.

BEYNON, R.J. **Proteolitic Enzymes:** a practical approach. New York: Oxford University.Press., p. 257, 1996.

BEZERRA, S. A. **Gestão ambiental da propriedade suinícola: um modelo baseado em 307 um biossistema integrado.** Revista Ciências Empresariais da UNIPAR, v.6, p.153-186, 308 2005.

BHAVSAR, K.; SHAH, P.; SONI, S. K.; KHIRES, J. M. **Influence of pretreatment of agriculture residues on phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions.** African Journal of Biotechnology, v. 7, p. 1101-1106, 2008.

BHAVSAR, K.; KHIRES, J. M. **Current research and future perspectives of phytase bioprocessing.** RSC Advances, v. 4, p. 26677–26691, 2014.

BHAVSAR, K.; RAVI KUMAR V.; KHIRES J. M. **High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 9, p. 1407-1417, 2011.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. **Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India.** Journal of Scientific and Industrial Research, v. 72, 2013.

BITAR, K.; REINHOLD, J. G. **Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man.** Biochimica et Biophysica Acta, n. 268, p. 442–452, 1971.

BOHN, L. MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. **Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding.** Journal of Zhejiang University-Science B, v. 9, n. 3, p.165–191, 2008.

BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A. **Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia* sp. C1112.** Asian Journal of Food and Agro-Industry, v. 5, n. 3, p. 226-233, 2012.

BOYCE, A.; W ALSH, G. **Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer.** Journal of Biotechnology, v.132, p.82-87, 2007.

BOZZO, G. G.; RAGHOTHAMA, K. G.; PLAXTON, W. C. **Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from**

phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. European Journal of Biochemistry, v. 269, n. 24, p. 6278–6286, 2002.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,** Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-258, 1976.

BÜTTNER, R.; BODE, R.; BIRNBAUM, D. **Characterization of extracellular acid phosphatases from the yeast *Arxula adeninivorans*.** Zeitschrift Mikrobiologie, v. 146, p.399-406, 1991.

CANNON, P. F.; KIRK, P. M. **Fungal families of the world.** CABI Publishing Series, UK, p. 130, 2007.

CARVALHO, F. **Construção e avaliação de desempenho de um *spray dryer* piloto.** Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos), Universidade Federal de Lavras, 2010.

CASEY, A.; WALSH, G. **Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142.** Bioresource Technology, v. 86, v. 183- 188, 2003.

CASEY, A.; WALSH, G. **Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest.** Journal of Biotechnology, v.110, p. 313–322, 2004.

CHADHA, B.S.; GULATI, H.; MINHAS, M.; SAINI, H.S.; SINGH, N. **Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*.** World Journal Microbiology and Biotechnology, v. 20, p. 105–109, 2004.

CHELIUS, M. K.; WODZINSKI, R. J. **Strain improvement of *A. niger* for phytase production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 41, p. 79–83, 1994.

CHEN, YI.; XIE, M-Y.; NIE, S-P.; LI, C.; WANG, Y-X. **Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*.** Food Chemistry, v. 107, n. 1, p. 231-241, 2008.

CHENG, C.; LIM, B.L. **Beta-propeller phytases in the aquatic environment.** Archives of Microbiology, v. 185, p.1–13, 2006.

CHENG, C.; SUN, J.; ZHENG, F.; WU, K.; RUI, Y. **Molecular identification of clinical “difficult-to-identify” microbes from sequencing 16S ribosomal DNA and internal transcribed spacer 2.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, doi:10.1186/1476-0711-13-1, 2014.

CHERYAN, M. **Phytic acid interactions in foods systems.** Food Science and Nutrition, v.13, p.297-335, 1980.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U. J. **Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors**. Biochemical Engineering Journal, v. 10, n. 2, p. 143-153, 2002.

COBAN, H. B.; DEMIRCI, A. **Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation**. Bioprocess Biosystems Engineering, v. 37, n. 4, p. 609-616, 2014a.

COBAN, H. B.; DEMIRCI, A. **Enhanced submerged *Aspergillus ficuum* phytase production by implementation of fed-batch fermentation**. Bioprocess and Biosystems Engineering, DOI 10.1007/s00449-014-1236-z, 2014b.

COLLOPY, P. D.; ROYSE, D. J. **Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 25, p. 7518-7524, 2004.

COSTANTINO, R.H.; LANGER, R.; KLIBANOV, M. **Solid-phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions**. Journal Pharmaceutical Science, v. 83, n.12, p.1662-1669, 1994.

COOKE, D.E.L., DRENT, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G., BRASIER, C.M. **A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes**. Fungal Genetic Biology, v. 30, p.17-32, 2000.

COOPER, J. R.; GOWING, H. S. **Mammalian small intestine phytase (EC 3.1.3.8)**. British Journal of Nutrition, v. 50, p. 673-678, 1983.

COPLEY, J. **Ecology goes underground**. Nature, London, v. 406, p.452-454, 2000.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M., CAVACO-PAULO, A. **Studies of stabilization of native catalase using additives**. Enzyme and Microbial Technology. v. 30, p. 387-391, 2002.

COWIESON, A. J.; O'NEILL, H. M.; BEDFORD, M. R. **Enzymes beyond phytase in poultry nutrition**. Poultry Research Foundation, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, NSW 2570, AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, Wiltshire, UK Disponível em: http://www.thepoultryfederation.com/public/userfiles/files/Cowieson_Enzymes%20beyond%20phytase%20in%20poultry%20nutrition_abstract.pdf. Acesso em: 24 out. 2014.

COWIESON, A.J., SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. **Uso de Fitase e suas implicações na digestão e absorção de nutrientes**. Anais da Conferência APINCO, Santos, SP, 2008.

CUI, Y-H.; ZHANG, K-C. **Effect of metal ions on the growth and metabolites production of *Ganoderma lucidum* in submerged culture**. African Journal of Biotechnology v. 10, n. 56, p. 11983-11989, 2011.

DANISCO ANIMAL NUTRITION. Disponível em: <http://www.danisco.com>. Acesso em 24 out. 2014.

DAVIES, M. I.; MOTZOK, I. **Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: separation of isoenzymes, zinc contents and in vitro effects of zinc**. Comparative Biochemistry and Physiology, 42B, 345–356, 1972.

DAVIES, N. T.; FLETT, A. A. **The similarity between alkaline phosphatase (EC3.1.3.1) and phytase (EC 3.1.3.8) activities in rat intestine and their importance in phytate-induced zinc deficiency**. British Journal of Nutrition, v. 39, p. 307–316, 1978.

DEVI, P. S. V.; PRASAD, Y. G. In: **Nomuraea rileyi a potential mycoinsecticide**. Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture. Rajeev K. Upadhyay, K.G. Mukerji, B. P. Chamola. Springer Science & Business Media, v. 2, 2001, p. 30.

DIBENEDETTO G. **Acid phosphatase in Schizosaccharomyces pombe. I. Regulation and preliminary characterization**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 286, n. 2, p. 363-74, 1972.

DSM, ANIMAL NUTRITION & HEALTH. Disponível em: http://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-feedenzymes/products-feed-phytases.html. Acesso em: 24 out. 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances**. Analytical Biochemistry, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Boca Raton: CRC., 1985.

EFSA. **Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed and of the scientific panel on genetically modified organisms on the safety and efficacy of the enzyme preparation Natuphos® (3-phytase) produced by Aspergillus niger**. The EFSA Journal, v. 369, p. 1-19, 2006.

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). **The European Commission on the safety and efficacy of Phyzyme XP 10000 (TPT/L), 6- phytase, as feed additive for chickens for fattening, laying hens, ducks for fattening, turkeys for fattening, piglets (weaned), pigs for fattening and sows**. The EFSA Journal, v. 915, p. 1-10, 2008.

EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). **Scientific opinion on Ronozyme® P (6-phytase) as feed additive for chickens and turkeys for fattening, laying hens, and piglets (weaned), pigs for fattening and sows (poultry and pigs)**. The EFSA Journal, v. 8 (10), pp. 271. 2010.

EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). **Scientific opinion on the safety and efficacy of Optiphos® (6-phytase) as a feed additive for chickens and turkeys for fattening, chickens reared for laying, turkeys reared for breeding, laying hens, other birds for fattening and laying, weaned piglets, pigs for fattening and sows.** The EFSA Journal, vol. 9, p. 29, 2011.

EL-BATAL, A. I.; ABDEL KAREM, H. **Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation.** *Food Research International*, v. 34, p. 715-720, 2001.

ESCOBIN-MOPERA, L.; OHTANI, M.; SEKIGUCHI, S. SONE, T.; ABE, A.; TANAKA, M.; MEEVOOTISOM, V.; ASAN, K. **Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, p. 562-567, 2012.

ELSAS, J.D. van; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. **Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment.** *Journal of Microbiological Methods*, Washington, DC, v. 32, p. 133-154, 1998.

ESTEVE-GARCIA, E.; PEREZ-VENDRELL, A. M.; BROZ, J. **Phosphorus equivalence of a Consensus phytase produced by *Hansenula polymorpha* in diets for young turkeys.** *Archives of Animal Nutrition*, v. 59, p. 53-59, 2005.

ENZYMEDICA, INC. Disponível em: <http://www.thebetterhealthstore.com/Enzymedica-Digest-Basic-90capsules>. Acesso em: 20 out. 2014.

FARIA, T. Q.; MINGOTE, A.; SIOPA, F. VENTURA, R.; MAYCOCK, C.; SANTOS, H. **Design of new enzyme stabilizers inspired by glycosides of hyperthermophilic microorganisms.** *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 3025-3033, 2008.

FAROUK, A-E.; GREINER, R.; HUSSIN, A. S. M. **Purification and properties of a phytate-degrading enzyme produced by *Enterobacter sakazakii* ASUIA279.** *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, p. 1-9, 2012.

FARRUGGIA, B.; GARCIA, G.; D'ANGELO, C.; PICÓ, G. **Destabilization of human serum albumin by polyethylene glycols studied by thermodynamical equilibrium and kinetic approaches.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 20, p. 43-51, 1997.

FERNLEY, H.N.; WALKER, P.G. **Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate.** *Biochemical Journal*, v. 97, p.95-103, 1965.

FOGG, G. E.; COLLYER, D. M. In: **The accumulation of lipides by algae.** Chapter 12. *Algal Culture*. BURLEW, J. S. Carnegie Institution of Washington

Publication 600. Washington, D. C. 1953, p.177-178.

FONTANA, R. C. **Estudo da produção de poligalacturonases em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e airlift.** Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, 2009.

FU, S.; SUN, J.; QIAN, L. **Effect of Ca^{2+} on beta-propeller phytases.** Protein & Peptide Letters, v. 15, p. 39-42, 2008.

FUJITA, J.; FUKUDA, H.; YAMANE, Y.-I.; KIZAKI, Y.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SUZUKI, O.; WAKABAYASHI, S. **Critical importance of phytase for yeast growth and alcohol fermentation in Japanese sake brewing.** Biotechnology Letters, v. 23, p. 867-871, 2001.

FUNGI PERFECTI, **the finest mushroom products.** Disponível em: <http://www.fungi.com>. Acessado em 30 out. 2014.

GAO, Y., ZHOU, S., HUANG, M., XU, A, **Antibacterial and antiviral value of the genus Ganoderma P. Karst. species (aphyllophoromycet- ideae): a review.** International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 5, p. 235-246, 2003.

GARCHOW, B. G.; JOG, S. P.; MEHTA, B. D.; MONOSSO, J. M.; MURTHY, P. P. N. **Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: purification and structural characterization.** Protein Expression and Purification v. 46, 221-232, 2006.

GARGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. **Screening of fungi for phytase production.** Biotechnology Techniques, v. 11, p. 221-224, 1997.

GEORGE, T. S.; QUIQUAMPOIX, H.; SIMPSON, R. J. RICHARDSON, A. E. **In: Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates.** Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment. Turner, B. L.; Richardson, A. E.; Mullaney, E. J. CABI, p. 221, 2006.

GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. **A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability.** Bioresource Technology, v. 78, p. 221-224, 2001.

GEORGIEV, D.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A.; SLAVCHEV, A.; GARGOVA S. **Phytase production by *Candida melibiosica* 2491 alkalophylic strain.** Emirates Journal Food Agriculture, v. 25 p. 342-348, 2013.

GIBSON, D. M. **Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* on starch media.** Biotechnology Letters, v.9, p. 305-310, 1987.

GIBSON, D. M.; ULLAH, A. H. J. **Phytases and their action on phytic acid.** In: Morr  DJ, Boss WF, Loewus FA, editors. Inositol Metabolism in Plants. New York: Wiley-Liss, 1990. pp. 77-92.

GILANI S. G.; XIAO, C. W.; COCKELL, K. A. **Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality.** British of Journal Nutrition, v.108 (Suppl 2): p. 315–332, 2012.

GOLDSTEIN, D. **Laboratory Apparatus.** Patente US20130247767 A1, 2013.

GOMES, S.I.F. **Caracterização morfológica e molecular de *Tricholoma equestre* *T. auratum* para uma abordagem taxonômica.** Dissertação de mestrado em Microbiologia aplicada, Universidade de Lisboa, 2011.

GONÇALVES, H. B, JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA C. R.; GUIMARÃES, L. H. **Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates.** Journal of Microencapsulation, v. 30, n. 7, p. 624-31, 2013.

GO PIX PIC. Disponível em: <http://www.gopixpic.com/ganoderma>. Acesso em 30 out. 2014.

GORCOM, R. V.; HARTINGSVELDT, W. V.; PARIDON, P. V.; VEENSTRA, A.; LUITEN, R.; SELTEN, G. **Cloning and expression of microbial phytase.** Patente US 20060063243 A1, 2009.

GORDON, R. W.; ROLAND, D. A. **Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens.** Poultry Science, v. 77, p. 290-294, 1998.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K.D. **Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 303, n. 1, p. 107-113, 1993.

GREINER, R.; FAROUK, A.; ALMINGER, M.L.; CARLSSON, N.G. **The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp.** Canadian Journal of Microbiology, v. 48, p. 986-994. 2002.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. **Phytase for food application.** Food Technology and Biotechnology, 44: 125-140. 2006.

GREINER, R.; SILVA, L. G.; COURI, S. **Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9.** Brazillian Journal Microbiology, v. 40, p. 795-807, 2009.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. In: **Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use.** Enzymes in farm animal nutrition. Editors: Bedford, M. R.; Partridge, G. G.; Oxfordshire:, CAB, 2010, p. 96-128.

GUAN, G.P.; ZHANG, G. Q.; WU, Y.Y.; WANG, H.X.; NG, T.B. **Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom**

Pholiota nameko. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 111, n. 6, p. 641-5, 2011.

GUIBAULT, G.G.; SADAR, S.H.; GLAZER R.; HAYNES J. **Umbelliferone phosphate as a substrate for acid and alkaline phosphatase.** Analytical Letters, v. 1, p. 333-345, 1968.

GULL, I.; HAMEED, A.; ASLAM, M. S.; ATHAR, M. A. **Optimization of phytase production in solid state fermentation by different fungi.** African Journal of Microbiology Research, v. 7, n. 46, p. 5207-5212, 2013.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. **Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 35, p.1587-1596, 2008.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. **Screening of asporogenic mutants of phytase-producing *Aspergillus niger* CFR 335 strain.** Microbial Ecology in Health and Disease, v. 21, p. 57-63, 2009.

GWENDOLYN, J. **How to select the best phytase for your feed formulation.** Feed management, 2014.

HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J.; LOHSCHIEDT, M.; ZELDER, O. **Biotechnological production and applications of phytases.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 68, p. 588–597, 2005.

HARITHA, K.; SAMBASIVARAO, K.R.S. **Phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 under submerged fermentation conditions.** Asian Journal of Bio Science, v. 4, n. 2, p. 270-273, 2009.

HARLAND, B. F.; MORRIS, E. R. **Phytate: A good or a bad food component?** Nutrition Research v. 15, p. 733-754, 1995.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. **Fungal phytase as a potential breadmaking additive.** European Food Research and Technology, v. 213, n. 4-5, p. 317-322, 2001a.

HAROS, M.; ROSELL, C.M.; BENEDITO, C. **Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 11, p. 5450-5454, 2001b.

HEINONEN J. K.; LAHTI R.J. **A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase.** Analitical Biochemistry, v.113, p. 313-317, 1981.

HIMEDIA, Laboratories Pvt. Ltd, **RM027-Yeast extract**, 2014.

HOSSEINKHANI, B.; EMTIAZI, G.; NAHVI, I. **Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production.** African Journal of Biotechnology, v. 8, n. 17, p. 4229-4232, 2009.

HOWSON, S. J., AND DAVIS, R. P. **Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi.** Enzyme and Microbial Technology, v. 5, p. 377–382, 1983.

HUR, T-C.; KA, K-H.; JOO, S-H.; TERASHITA, T. **Characteristics of the amylase and its related enzymes produced by ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*.** Mycobiology, v. 29, n. 4, p. 183-189, 2001.

HUSSIN, A. S. M.; FAROUK, A-E.; GREINER, R. **Optimization of cultivation conditions for the production of phytate-degrading enzymes by *Enterobacter sakazakii* ASUIA279 isolated from Malaysian maize root.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2012.

ILLANES, A. **In: Enzyme purification.** Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Springer Science & Business Media, Valparaíso, Chile, 2008, p. 78.

IN, M.J.; SEO, W.S.; KIM, D.C.; OH, N.S. **Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain.** Process Biochemistry v. 44, p.122-126, 2009.

ICH - **International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.** Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 14 abr. 2014.

INADA, Y.; NISHIMURA, H.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMOTO, T.; SAHA, A.R.; SAITO, Y. **Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol modified lipase in benzene.** Biochemical Biophysical Research Communications, v. 122, p. 845-850, 1984.

IQBAL, T. H.; LEWIS, K. O.; COOPER, B. T. **Phytase activity in the human and rat small intestine.** Gut, v. 35, p. 1233–1236, 1994.

IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E. **Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens.** Med Mycol, v. 40, p. 87-109, 2002.

IYER, P.V.; ANANTHANARAYAN, L. **Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment.** Process Biochemistry v. 43, p. 1019-1032, 2008.

JAFARI, A. R.; SARRAFZADEH, M. H.; ALEMZADEH, I. AND VOSOUGHI, M. **Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*.** Journal Biological Science, v. 7, p. 270-275,

2007.

JASON D. MORROW, M.D. **Quantification and significance of protein oxidation in biological samples.** Drug metabolism reviews, v. 32, p. 307–326, 2000.

JERMUTUS, L.; TESSIER, M.; PASAMONTES, L.; VAN LOON, A.P.; LEHMANN, M. **Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case.** Journal of Biotechnology, v. 85, p. 15-24, 2001.

JIMÉNEZ, N.; GARCIA, M.L.; GALÁN, J.; VALLET, A.; OWEN, G.; WALL, G.M. **Stability improvement of a liquid enzyme product.** AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 4, 2009.

JONG, S.C.; Birmingham, J.M. **Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*.** Advances in Applied Microbiology, v. 37, p. 101–134, 1992.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. **Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties.** Process Biochemistry, v. 40, p.1263-1270, 2005.

JU, L. K.; HO, C.S.; SHANADAN, J. F. **Effects of CO₂ on the rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations.** Biotechnology and Bioengineering, v. 38, p. 1223-1232, (1991).

JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo.** EMBRAPA. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 33, 2002.

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V. T. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse.** Bioresource Technology, v. 114, p. 735–739, 2012.

KEN, C-F.; CHEN, H-T.; CHANG, R-C.; LIN, C-T. **Biochemical characterization of a catalase from *Antrodia camphorata*: expression in *Escherichia coli* and enzyme properties.** Botanical Studies, v. 49, p.119-125, 2008.

KHARE, S.K.; JHA, K.; GUPTA, M.N. **Entrapment of wheat phytase in polyacrylamide gel and its application in soy milk phytate hydrolysis.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 19, p. 193–198, 1994.

KIM, B.K.; CHO, H.Y.; KIM, J.S.; KIM, H.W.; CHOI, E.C. **Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVIII). Antitumor components of the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*.** Korean Journal of Pharmacology, v.24, p. 203–212. 1993.

KIM, Y.; KIM, H.; BAE, K.; YU, J.; OH, T. **Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11.** Enzyme and Microbial

Technology, v. 22, p. 2-7, 1998.

KIM, D. S.; GODBER, J. S.; AND KIM, H. R. **Culture conditions for a new phytase-producing fungus.** Biotechnology Letters, v. 21, p. 1077–1081, 1999a.

KIM, D-H.; OH, B-C.; CHOI, W-C.; LEE, J-K.; OH, T-K. **Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive.** Biotechnology Letters, 21: 925–927, 1999b.

KIM, H. W.; KIM, Y. O.; LEE, J.H.; KIM, K. K.; KIM, Y. J. **Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*.** Biotechnology Letters, v. 25, p. 1231–1234, 2003.

KJELDAHL, J. **A new method for the determination of nitrogen in organic matter.** Analytical Chemistry, v. 22, p.366, 1883.

KLEIST, S., MIKSH, G., HITZMAN, B., ARNDT, M.,FREISH, K., FLASCHEL, E. **Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 61, p. 456-62, 2003.

KOHN, W.D.; KAY, C.M.; HODGES, R.S. **Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs.** Journal of Molecular Biology, v. 267, p. 1039 –1052, 1997.

KONAZANI, V.; SATYANARAYANA, T. **In: Potential Applications of Phytases in Aquaculture.** Industrial exploitation of microorganisms. MAHESHWARI D. K.; DUBEY, R. C.; SARAVANAMUTHU, R.I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. Nova Deli, 2012, p. 272.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. **Molecular and catalytic properties of phytate- degrading enzymes (phytases).** The International Journal of Food Science and Technology, v. 37, p. 791–812, 2002.

KORNEGAY, E. T.; DENBOW, D. M.; YI, Z., RAVINDRAN, V. **Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soybean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus.** British Journal of Nutrition, v. 75, p. 839–852, 1996.

KOSHY, J. C.; SHARABI S. E.; FELDMAN, E. M.; HOLLIER, L. H.; PATRINELY, J. R.; SOPARKAR, C. N. S. **Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments.** Journal of Drugs in Dermatology, v. 11, n. 4, p. 507-12, 2012.

KRISTJÁNSSON, M.M.; KINSELLA, J.E. **Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic, and experimental aspects.** Advances in Food and Nutrition Research, v. 35, p. 237–316. 1991.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P.; DE BOECK G.; BECKER, K. **Phytate and phytase in fish nutrition**. Journal of animal physiology and animal nutrition, v. 96, n. 3, p. 335-364, 2012a.

KUMAR P.; CHAMOLI, S.; AGRAWAL, S. **Enhanced phytase production from *Achromobacter* sp. PB-01 using wheat bran as substrate: prospective application for animal feed**. Biotechnology Progress, v. 28, n. 6, p. 1432-42, 2012b.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. **Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review**. Food Chemistry v. 120, p. 945–959, 2010.

KUMARI, M. P.; KUMAR, M. S.; RAO, G. N. **Isolation of phytase producing fungi and optimization of production parameters**. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences, v.2, n. 2, p. 161-176, 2011.

KUO, M. 2004. **The Tricholomataceae**. Disponível online em MushroomExpert.Com Website: <http://www.mushroomexpert.com/tricholomataceae.html>. Acesso em: 01 out. 2014.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAN, G. Q.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. **Culture conditions influencing phytase production of *Mitsuokella jalaludinii*, a new bacterial species from the rumen of cattle**. Journal Applied Microbiology, v. 93, n. 4, p. 668-74, 2002.

LAN, G. Q.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. **Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium**. African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 59, p. 12766-12776, 2011.

LASCELLES, J. **The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of *Rhodospseudomonas spheroides***. Journal of General Microbiology, v. 23, p. 487-498, 1960.

LASSEN, S.F. BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, P.R.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, C.C. **Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp. and *Trametes pubescens***. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 4701-4707, 2001.

LATA, S.; RASTOGI, S.; KAPOOR, A.; IMRAN, M. **Optimization of culture conditions for the production of phytase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685**. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, v. 4, n. 2, p. 224-235, 2013.

LATTA, M.; ESKIN, M. **A simple and rapid colorimetric method for phytate determination**. Journal Agricultural Food Chemistry, v. 28, p. 1313–1315, 1980.

LE HIR, A. **Noções de Farmácia Galênica**. 6 ed. São Paulo, p.108-135, 1997.

LEE, S. H.; CHO, J.; BOK, J.; KANG, S.; CHOI, Y.; LEE, P. C. W. **Characterization, gene cloning, and sequencing of a fungal phytase, PhyA, from *Penicillium oxalicum* PJ3**. Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 45, n. 4, 2015.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. **Phytase enzymology, applications, and biotechnology**. Biotechnology Letters, v. 25, n. 21, p. 1787-1794, 2003.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, M. J. **Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme**. Annual of Review of Animal Bioscience, v. 1, p. 283–330, 2013.

LI, M.; WANG, H.; NG, T. B. **Isolation of a phytase with distinctive characteristics from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii***. Protein & Peptide Letters. n. 4, p. 459-466, 2013.

LIM, B.L.; YEUNG, P.; CHENG, C.; HILL, J.E. **Distribution and diversity of phytate- mineralizing bacteria**. The ISME Journal, v. 1, p. 321–330, 2007.

LINEWEAVER, H.; BURK. D. **The determination of enzyme dissociation constants**. Journal of the American Chemical Society, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LINN, S. In: **Strategies and considerations for protein purifications. Guide to protein purification**. Burgess, R. R.; Deutscher, M. P. Academic Press Elsevier Inc., Oxford, 2009, p. 9-10.

LUDKE, M. C. M.; LOPEZ, J.; LUDKE, J. V. **Fitase em dietas para suínos em crescimento: (II) parâmetros de carcaça e ossos**. Ciênica Rural, v.32, p.103-118, 2002.

LUNG, S. C.; CHAN, W. L.; YIP, W.; WANG, L.; YEUNG, E. C.; LIM, B. L. **Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization**. Plant Science, v. 169, n. 2, p. 341–349, 2005.

LUNG, S. C.; LEUNG, A.; KUANG, R.; WANG, Y.; LEUNG, P.; LIM, B. L. **Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase**. Phytochemistry, v. 69, n. 2, p 365-373, 2008.

LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; TORRES, D. P.; NUNES, M. D.; SILVA, J. S.; MANTOVANI, H. C.; KASUYA, M. C. M. **Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in Jatropha biodiesel residues.** LWT - Food Science and Technology, v. 5,0 p. 575-580, 2013.

MAGALHÃES NETTO, F. **Influência da atividade de água na temperatura vítrea.** In: JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Atividade de água em alimentos. Campinas: ITAL, p. 4-14, 1997.

MALLER, A.; MOTA, A. M. O.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA J. A.; POLIZELI M. L. T. M. **Fermentation pH in stirred tank and air-lift bioreactors affects phytase secretion by *A. japonicus* differently but not the particle size.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 32, p. 39-44, 2014.

MCCOLLUM, E.V.; HART, E.B. **On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissue.** Journal of Biological Chemistry, v. 4, p. 497–500, 1908.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition.** Ed. Elsevier, 2ª edição, 2003.

METZLER, D. E.; METZLER, C. M. **In: The catalysts of cells.** Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. Academic Press, v. 1, Ames, Iowa, 2001.

MICHELS, A.; GHOSH, R.; BESSLER, C.; LOWIS D. **Benzophenone or benzoic acid anilide derivatives containing carboxyl groups as enzyme stabilizers.** US n. 7968508 B2, 2011.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTAHL, B. **Spray-drying of trypsin – surface characterization and activity preservation.** International Journal of Pharmaceutics, v. 188, p. 243-253, 1999.

MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. **Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella* sp. Db-3fj711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation.** Innovative Romanian Food Biotechnology, v. 10, p. 18-27, 2012.

Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, **Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004.** Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692> . Acesso em: 10 out. 2014.

MOHAMAD, N. M.; ALI, A. M.; SALLEH, H. M. **Carbon sources utilization profiles of thermophilic phytase producing bacteria isolated from hot-**

spring in Malaysia. International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering, v. 6, n. 4, 2012.

MONGA, M.; GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SONI, G. **Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger*.** Mycosphere, v. 2, n. 2, 129–134. 2011.

MIYAKE, N.; KIM, M.; KURATA, T. **Stabilization of L-ascorbic acid by superoxide dismutase and catalase.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 63, n. 1, p. 54-57, 1999.

MOHIDEM, N.A.; MAT, H.B. **Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol–gel silica with additives.** Journal of Sol-Gel Science and Technology, v. 61, p. 96-103, 2012.

MONTEIRO, P. S. **Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal.** Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2011.

MONTEIRO, P. S.; MELO, R. R.; TAVARES, M. P.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; PEREIRA, O. L.; REZENDE, S. T. **Production optimization, characterization and evaluation of *Rhizopus stolonifer* phytase in the hydrolysis of phytate in animal feed.** Revista Brasileira de Agrociência de Pelotas, v.18, n. 2-4, p.117-132, 2012.

MORAIS, S. M. F. de. **Tolerância alcoólica, atividade fermentative e permeabilidade celular em *S. cerevisiae*.** Dissertação de Mestrado da Universidade de São Paulo, 1984.

MOREIRA, K. A.; HERCULANO, P. N.; MACIEL, M. H. C.; PORTO, T. S.; SPIER, M. R.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F.; SOCCOL, C. R. **Optimization of phytase production by *Aspergillus japonicus* Saito URM 5633 using cassava bast as substrate in solid state fermentation.** African Journal of Microbiology Research, v. 8, n. 9, p. 929-938, 2014.

MURLIDHAR, R. V.; PANDA, T. **Fungal protoplast fusion: A review.** Bioprocess Biosystems Engineering, v. 22, p. 429-431, 2000.

NAKAMURA, Y.; FUKUHARA, H.; SANO, K. **Secreted phytase activities of yeasts.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 64, p. 841-844, 2000.

NAMPOOTHIRI, K. M.; TOMES, G.J.; ROOPESH, K.; SZAKACS, G.; NAGY V.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. **Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 118, n. 1-3, p. 205-214, 2004.

NASCIMENTO, J.C.S. **Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.**

Dissertação de Mestrado em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

NASCIMENTO, J.C.S.; SOUZA, F.A.S.D.; PORTO, T.S.; MUSSATTO, S.I. TEIXEIRA, J.A.; PORTO, A.L.F. **Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924**. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2013.

NAMPOOTHIRI, K.M.; TOMES, G.J.; ROOPESH, K.; SZAKACS, G.; NAGY, V.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 118, p. 205-214, 2004.

NCBI (2014). GenBank. **International Nucleotide Sequence Database Collaboration**. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em: 02 out. 2014.

NEVES, L. C. M. **Obtenção de enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisie* W303-181**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003.

NEVES, M.L.C.; PORTO, T.S.; SOUZA-MOTTAE, C.M.; SPIER, M.R.; SOCCOL, C.R.; MOREIRA, K.A.; PORTO, A.L.F. **Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG-citrate aqueous two-phase systems**. Fluid Phase Equilibria, v. 318, p. 34-39, 2012.

NIELSEN, L. K.; SIMONSEN, O.; WERNTOFT, K.; ILESTAM, N. **A stabilized liquid enzyme composition**. WO, n. 2007113241 A1, 2007.

NIRMAL, N.P.; LAXMAN, R. S. **Enhanced thermostability of a fungal alkaline protease by different additives**. Enzyme Research, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/109303>, 2014.

NORIKO, M.; MIOK, K.; TADÃO, K. **Stabilization of L-ascorbic acid by superoxide dismutase and catalase**. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 63, p. 54 –57, 1999.

Novozymes e DSM, **Ronozyme NP the better phytase**. Disponível em: <http://www.readbag.com/dsm-en-us-downloads-dnp-52000-ronozyme-np-new>. Acessado em: 25 out. 2014.

NUTRITECK. Disponível em: <http://www.nutriteck.com/index.html>. Acesso em: 25 out. 2014.

NYMAN, M. E. and BJÖRCK, I. M. **In vivo effects of phytic acid and polyphenols on the bioavailability of polysaccharides and other nutrients**. Journal of Food Science, v. 54, p. 1332–1335, 1989.

Ó'FÁGÁIN, C. **Enzyme stabilization - recent experimental progress.** Enzyme and Microbial Technology, v. 33, n. 2-3, p. 137-149, 2003.

OHTAKE, S.; KITA, YOSHIKO; ARAKAWA, T. **Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 63, p. 1053-1073, 2011.

ONEM H.; NADAROGLU, H. **Preparation and properties of purified phytase from Oakbug Milkcap (*Lactarius Quietus*) immobilised on coated chitosan with iron nano particles and investigation of its usability in food industry.** Journal of Food and Nutrition Research, v. 2, p. 938-945, 2014.

ORBAN, J. I.; ADEOLA, O.; STROSHINE, R. **Microbial phytase in finisher diets of White Pekin ducks: Effects on growth performance, plasma phosphorus concentration, and leg bone characteristics.** Poultry Science, v. 78, p. 366-377, 1999.

OTHMAN, N. Z.; ELSAYED, E. A.; MALEK, R. A.; RAMLI, S.; MASRI, H. J.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R.; WADAAN, M. A.; HATTI-KAUL, R.; EL ENSHASY, H. A. **Aeration rate effect on the growth kinetics, phytase production and plasmid stability of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3).** Journal of Pure and Applied Microbiology, v.8, n. 4. p. 2721-2728, 2014.

PANDEY, A. **Solid-State Fermentation.** Ed., Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, p. 3-10, 1994.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** Current Science, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.** Biotechnology Advances, v. 22, p. 189-259, 2004.

PAPAGIANNI, M.; NOKE, S. E.; FILE, K. **Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance.** Food Technology Biotechnology, v. 39, p. 319-326, 2001.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. **Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation.** Process Biochemistry, v. 35, p. 397-402, 1999.

PARTON, C.; WILLIS, P. **Strain preservation, inoculum preparation and development.** In: Fermentation a Practical Approach, B. McNeil, L. M. Harvey (Eds.), Oxford University Press, Oxford, p. 123-155, 1990.

PATERSON, R. R. M. **Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory.** Phytochemistry, v. 67, p. 1985-2001, 2006.

PATTNAYAK, P. **Excipient mediated biostabilization of protein using spray drying technique**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia), Instituto National de Tecnologia, Rourkela, Índia, 2010.

PEDROSO, P. R. F. **Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

PERIČIN, D. M.; RADULOVIC, L. M.; ČURČIN, S. S. **Extraction of endopectinase activity from the culture filtrate of *Polyporus squamosus* by aqueous two-phase systems composed of low molecular mass polyethylene glycol and phosphate salt**. APTEFF, v. 35, p. 1-280, 2004.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005. p. 444.

PETERSEN, **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

POLIDORO, T.A. **Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, 2009.

PRAVEEN, K, USHA, K.Y.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. **Kinetic properties of manganese peroxidase from the mushroom *Stereum ostrea* and its ability to decolorize dyes**. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, n11, p. 1540-8. 2012.

PROMDONKOY, P.; TANG, K.; SORNLAKE, W.; HARNPICHARNCHAI, P.; KOBAYASHI, R.S.; RUANGLEK, V.; UPATHANPREECHA, T.; VESARATCHAVEST, M.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT S. **Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris***. FEMS Microbiology Letters, v. 290, n. 1, p. 18-24, 2009.

RADCLIFFE, J. S.; KORNEGAY, E. T. **Phosphorus equivalency value of microbial phytase in weanling pigs fed a maize-soyabean meal based diet**. Journal of Animal Feed Sciences, v. 7, p. 197-211, 1998.

RAJCHENBERG, M.; MEIJER, A.A.R. **New and noteworthy polypores from Paraná and São Paulo States, Brazil**. Mycotaxon, v. 38, p. 173-185, 1990.
SAIKI, R.K.; SCARF, F.; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. **Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science (Washington), DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

RAMAN, A. **Antimicrobial affects of tea-tree oil and its major components on *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and**

Staphylococcus epidermidis. Letters in Applied Microbiology, v.21,n. 4, p. 242-245, 1995.

RANI, R.; ARORA, S.; KUMAR, S.; GHOSH, S. **Optimization of medium components for the production of phytase by *R. Oryzae* using statistical approaches**. Journal of Bioremediation & Biodegradation, S18:003. doi: 10.4172/2155-6199.S18-003, 2013.

RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T.; DENBOW, D. M.; YI, Z.; HULET, R. M. **Response of turkey poults to tiered levels of Natu- phos phytase added to soyabean meal-based semi-purified diets containing three levels of non-phytate phosphorus**. Poultry Science, v. 74, p. 1843-1854, 1995.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. **Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate**. Plant Journal, v. 25, n. 6, p. 641–649, 2001.

RIGAS, F.; PAPADOPOULOU, K.; DRITSA, V.; DOULIA, D. **Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology**. Journal of Hazardous Materials, v. 140, n. 1–2, p. 325-332, 2007.

ROCHA, J.M.S; GIL, M.H.; GARCIA, F.A.P. **Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media**. Journal of Biotechnology, v. 66, p. 61-67, 1998.

RODRIGUES, P. B.; BRITO, J. A. C.; SILVA, E. L.; NASCIMENTO, G. A. J. **Manejo na dieta para reduzir o impacto ambiental da excreção de nutrientes na avicultura**. In: VII Seminário de Aves e Suínos, Anais, Belo Horizonte: AVISUI Regiões. 2007.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; PARADA, J. L. MEDEIROS, A.B.P.; CARVALHO, J. C.; LACERDA, L. G.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A. SOCCOL' C. R. **Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation**. Process Biochemistry, v. 48, p. 374–379, 2013.

RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, G. R.; GONZALEZ-GARCIA, R., GRAJALES-LAGUNES, A.; RUIZ-CABRERA, M.A.; ABUD-ARCHILA, M. **Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product**. Drying Technology, v. 23, n. 4, p. 955-973, 2005.

ROMMELE, G.; HAGEMANN, R. **Sucrose, sodium metabisulfite**. US, n. 4118515 A, 1978.

ROSTAGNO, H.S.**Composição de alimentos e exigências nutricionais**. (Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos). Viçosa: UFV, 2005. 114p.

ROOPASHRI, A. N.; VARADARAJ, M. C. **Soy whey based medium for**

optimized phytase activity in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 5421 and α -D-galactosidase and antibacterial activities in *Lactobacillus plantarum* MTCC 5422 by response surface methodology. Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 3, p. 519-526, 2014.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. In: Phytase. PANDEY, A. **Enzyme Technology**. Springer Science & Business Media, NY, 2006a, p. 359.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*.** Bioresource Technology, v. 97, p. 506–511, 2006b.

ROY, T.; BANERJEE, G.; DAN, S.K.; RAY, A.K. **Optimization of fermentation conditions for phytase production by two strains of *Bacillus licheniformis* (LF1 and LH1) isolated from the intestine of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton).** Proceedings of the Zoological Society, v. 66, Issue 1, pp 27-35, 2013.

ROYSE, S. **Scaling up for mammalian cell culture.** Chemical Engineer, v. 11, p. 12-13, 1987.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of pharmaceutical excipients.** London, Pharmaceutical Press, 2009.

RUSSELL, R.; PATERSON, M. ***Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory.** *Phytochemistry*, v.67, n.18, p. 1985–2001, 2006.

SABU, A.; SARITA, S.; PANDEY, A.; BOGAR, B.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R. **Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 102-103, n.1-6, p. 251-260, 2002.

SALMON, D.N.; PIVA, L.C.; BINATI, R.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R.; SPIER, M.R. **Formulated products containing a new phytase from *Schizophyllum* sp. phytase for application in feed and food Processing.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, p. 1069-1074, 2011.

SALMON, D.N.X.; PIVA, L.C.; BINATI, R.L.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; SPIER, M.R. **A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability.** Bioprocess Biosystems Engineering, v. 35, p. 1067-1079, 2012.

SALMON, D. N. X.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R. VANDENBERGHE, L. P. S. MONTIBELLER, V. W.; BIER, M. C. J.; FARACO, V. **Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56.** Fungal Biology, v. 118, p. 655-662, 2014a.

SALMON, D.N.X.; WALTER, A.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PORTO A.L.F.; SPIER, M. R. **Aqueous two-phase extraction for partial purification of *Schizophyllum commune* phytase produced under solid-state fermentation.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 32, p. 45–52, 2014b.

SALLEH, H. M.; Mel, M.; Jami, M. S.; Amid, A.; Bala, M. **Optimization of spray drying process conditions for recombinant stem bromelain.** Advances in Environmental Biology, v. 8, n. 3, p. 696-703, 2014.

SAMBORSKA, K. **Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase using stabilizing additives.** Acta Agrophysica, v. 9 (1), p. 233-244, 2007.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C.; GAYTÁN-OYARZÚN, J.C. **Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites.** African Journal of Biotechnology, v. 5, n. 20, p. 1864-1867, 2006.

SANDBERG, A-S. In: **Food Processing Influencing Iron and zinc Bioavailability.** The Ninth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. Fischer, P. W. F. NRC Research Press, Alberta, Canada, 1997, p. 11.

SANTOS, T. T.; SHEEHAN, N. **Analysis of phytate and phytase.** In: Commercial experience of phytase analysis: factors which influence phytase recovery. International Phytase Summit, 2010.

SARIYSKA, M.V.; GARGOVA, S.A.; KOLEVA, L.A.; ANGELOV, A.I. ***Aspergillus niger* phytase: purification and characterization.** Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 19, p 98–105, 2005.

SARLIN, P. J.; PHILIP R. **A molasses based fermentation medium for marine yeast biomass production.** International Journal of Research in Marine Sciences, v. 2, n. 2, p. 39-44, 2013.

SASIREKHA, B.; BEDASHREE, T.; CHAMPA, K. L. **Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6.** European Journal Experimental Biology, v. 2, p. 95-104, 2012.

SATO, V. S.; JORGE, J A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARÃES, L. H. S. **Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray Drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants.** Microbiology Biotechnology, v. 24, n. 2, p. 177–187, 2014.

SCHENK, G.; GUDDAT, L.W.; GE, Y.; CARRINGTON, L.E.; HUME, D.A.; HAMILTON, J. **Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants**. *Gene*, v. 250, p. 117–125, 2000.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. In: Cinética de processos fermentativos. **Biotecnologia industrial, Engenharia Bioquímica**. 1a. ed., v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 6, 2001.

SCHOMBURG, D.; CHANG, A.; SCHOMBURG, I. In: **Class 3 Hydrolases EC 3.1 – 3.421**. *Handbook of Enzymes*. Schomburg, D.; Schomburg, I. Segunda edição Springer, Berlin, p. 61, 2009.

SCHRAMM, V. G. **Interação de xilanase e fitase em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte**. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, 2004.

Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). **European commission on the safety and efficacy of the product Quantum™ Phytase 5000 L and Quantum™ Phytase 2500 D (6-phytase) as a feed additive for chickens for fattening, laying hens, turkeys for fattening, ducks for fattening and piglets (weaned)**. *The EFSA Journal*, v. 627, p.1-27, 2008.

SCOPES, R. **Protein Purification: Principles and Practice**. Terceira edição, Springer-Verlag, New York, 1994.

SHAH, P.; BHAVSAR, K.; SONI, S. K.; KHIRE, J. M. **Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, p. 373-380, 2009.

SHANHIDI, F.; HAN, X.Q. **Encapsulation of food ingredients**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, p. 501-547, 1993.

SELLA, S.R.B.R.; MASETTI, C.; FIGUEIREDO, L.F.M.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MINOZZO, J.C.; SOCCOL, C.R. **Soybean molasses-based bioindicator system for monitoring sterilization process: Designing and performance evaluation**. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, n. 1, p. 75-87, 2013.

SELVAMOHAN, T.; RAMADAS, V.; REJIBEULA, M. **Optimization of phytase production by *Pseudomonas* sp. isolated from poultry faces**. *International Journal of Modern Engineering Research*, v. 2, p.1326-1330, 2012.

SHAH, K.B.; TRIVEDI, R. **Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus tamari***. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 3, p. 775-783, 2012.

SHANMUGAM, S. In: Purification Enzymes. **Enzyme Technology**. I. K. International Pvt Ltd, 2009, p. 29.

SHAMNA, K. S.; RAJAMANIKANDAN, K. C. P.; MUKESHKUMAR, D. J.; BALAKUMARAN, M. D.; KALAICHELVAN, P. T. **Extracellular production of phytases by a native *Bacillus subtilis* strain**. Annals of Biological Research, v. 3, p. 979-987, 2012.

SHARMA, R. **Enzyme inhibition: mechanisms and scope, enzyme inhibition and bioapplications**. Prof. Rakesh Sharma (Ed.), InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/enzyme-inhibition-and-bioapplications/enzyme-inhibition-mechanisms-and-scope>. Acesso em: 18 dez. 2014.

SHEPPY C. **The current feed enzyme market and likely trends**. In MR Bedford (ed) **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI, Publishing, Oxon, U.K. p.1-10. 2001.

SHIEH, T. R.; WARE, J. H. **Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 16, p.1348-1351, 1968.

SHIMIZU, M. **Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1**. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 57, p.1354-1365, 1993.

SHIVANNA, G. B.; VENKATESWARAN, G. **Phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through submerged and solid-state fermentation**. The Scientific World Journal. Article ID 392615, p. 6, 2014.

SIEGEL, M.H., ROBINSON, C.W. **Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology**. Chemical Engineering Science, v. 47, p. 3387-3394, 1992.

SILVA, D.P.; PESSOA Jr. A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. **Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae***. Applied Biochemistry and Biotechnology., Totowa, v. 91, n. 3, p. 605-613, 2001.

SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii***. Dissertação (Mestrado do Programa em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2010.

SINGH, B., SATYANARAYANA, T. **Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile***. Bioresource Technology, v.10, p. 2046-2051, 2009.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. **Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds**. African Journal Biotechnology, v. 11,p.12314-12324, 2012.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. **Phytase production by thermophilic mold *S. thermophile* in solid-state fermentation and its application in dephytinization of sesame oil cake**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 133, p. 239-250, 2006.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. **Phytase production by *S. thermophile* in a cost-effective cane molasses medium in submerged fermentation and its application in bread**. Journal of Applied Microbiology, v.105, p. 1858–1865. 2008.

SIMONS, P. C. M.; VERSTEEGH, H. A. J. **Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs**. British Journal Nutrition, v. 64, p. 525-540, 1990.

SINGH B.; KUNZE G.; SATYANARAYANA, T. **Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases**. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, v. 6, n. 3, p. 69–87, 2011.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. **Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds**. African Journal of Biotechnology, v. 11, p. 12314-12324, 2012.

SINGH, N. K.; JOSHI, D. K.; GUPTA, R. K. **Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters**. Jundishapur Journal of Microbiology, v. 6, n. 5, p. 2013.

SINGH, A.; AGRAWAL, A.K.; DARMWAL, N.S.; ABIDI, A.B. **Influence of additives on the storage stability of cellulases from *Aspergillus niger***. Zentralblatt für Mikrobiologie, v. 146, p. 391–392, 1991.

SLIVA, D. ***Ganoderma lucidum* in cancer research**. Leukemia Research, v. 30, p. 767–768, 2006.

SLOMINSKI, B.A.; DAVIE, T.; NYACHOTI, M.C.; JONES, O. **Heat stability of endogenous and microbial phytase during feed pelleting**. Livestock Science, v. 109, n. 1-3, p. 244-246, 2007.

SLOTH, J.; BACH, P.; JENSEN, A.; KIIL, S. **Evaluation method for the drying performance of enzyme containing formulations**. Biochemical Engineering Journal, v. 40, n.1, p. 121 – 129, 2008.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; KARP, S. G.; MONTIBELLER, V. W.; SALMON, D. N. X.; GOELZER, F.; BATISTA, M. C. T.; SOCCOL, V. T. **In: Enzymes production during value-addition of agro-industrial wastes**. BRAR S. K.; VERMA, M. Enzymes in value-addition of wastes. New York, Nova Science Publishers Inc, p. 4-7, 2014.

SONI, S. K.; MAGDUM, A.; KHIRE, J. M. **Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 26, p. 2009-2018, 2010.

SPIER, M.R.; GREINER, R.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. **Phytase production using citric pulp and other residues of the agro-industry in SSF by fungal isolates**. Food Technology Biotechnology, vol. 46, p.176–180, 2008.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; GREINER, R.; SOCCOL, C.R. **Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation**. Chemical Engineering Communications, v. 198, p. 286 – 297, 2011a.

SPIER, M.R.; FENDRICH, R.; ALMEIDA, P.; NOSEDA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; WOICIECHOWSKI, A.; SOCCOL, V.; SOCCOL, C.R. **Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization**. World Journal Microbiology Biotechnology, v. 27, p. 267-274, 2011b.

SPIER, M. R.; SALMON, D. N. X. BINATI, R. L.; PIVA, L. C.; MEDEIROS, A.B.P. SOCCOL, C. R. **Stability of new macromycetes phytases under room, cooling and freezing temperatures of storage**. Word Academy of Science, Engineering and Thechnology, v. 6, 2012.

SREEDEVI, S.; REDDY B.N. **Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus* sp. C43**. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences v. 2, p-218-231, 2012.

SURYA, K.K.; VANITHA, S.; SURESH, S.; RADHA, K.V. **Production and optimization of phytase from *Rhizopus oligosporus* using agro residues by solid state fermentation**. Middle-East Journal of Scientific Research, v. 17, p. 1839-1845, 2013.

STADEN, J.; HAAN, R.; ZYL, W. H. BOTHA, A.; VILJOEN-BLOOM, M. **Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510**. Federation of European Microbiological Societies, v. 7, p. 442–448, 2007.

STANLEY, G.; HARVEY, K.; SLIVOVA, V.; JIANG, J.; SLIVA, D. ***Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β 1 from prostate cancer cells**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 330, p. 46–52, 2005.

STATSOFT INC. 2005. **STATISTICA** (Data Analysis Software Systems) Version 5.0.

STEVENSON, F. J. **Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and micronutrients**. New York: Wiley, p. 176-177, 1986.

SU, C. H.; SUN, C. S.; JUAN, S. W.; HU, C. H.; KE, W. T.; SHEU, M. T. **Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes.** *Biomaterials*, v.18, n. 17, p. 1169-74, 1997.

SULABO R. C.; JONES C. K.; TOKACH M. D.; GOODBAND, R. D.; DRITZ, S. S.; CAMPBELL D. R.; RATLIFF B. W.; DEROUHEY, J. M.; NELSEN. J. L. **Factors affecting storage stability of various commercial phytase sources.** *Journal of animal science*, v. 89, n. 12, p. 4262-4271, 2011.

SUZUKI U, YOSHIMURA K, TAKAISHI M. **Über ein enzym 'Phytase' das anhydro-oxy-methylen diphosphorsaure' spalter.** *Tokyo Imper. Univ. Coll. Agric. Bull. V. 7*, p. 503-512, 1907.

SUZUKI, G. T.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. **Medium composition influence on Biotin and Riboflavin production by newly isolated *Candida* sp.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1093–1100, 2011.

SVS/MS, Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **PORTARIA Nº 540, Aditivos Alimentares**, de 27 out. 1997.

TAHIR, A.; MATEEN, B.; SAEED, S.; USLU, H. **Studies on the production of commercially important phytase from *Aspergillus niger* st-6 isolated from decaying organic soil.** *Micología Aplicada Internacional*, v. 22, p. 51-57, 2010.

The online industrial exhibition, direct industry. Disponível em: <http://www.directindustry.com>. Acesso em: 28 out. 2014.

THIES, C. **How to make microcapsules.** St Louis, Missouri: Lecture and Laboratory, 1995.

THOMPSON, L. U.; YOON, J. H. **Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid.** *Journal of Food Science*, v. 49,p.1228-1229, 1984.

TOMLINSON, R. V.; BALLOU, C.E. **Myoinositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by phytase.** *Biochemistry*, v. 1, p. 166–171. 1962.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. **Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carregados sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.

TRAN, T. T.; MAMO, G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL R. **A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 279–287, 2010.

ULLAH, A. H. J.; CUMMINS, B. J.; DISCHINGER, H. C. **Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase.**

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 178, p. 45-53, 1991.

ULLAH, A. H.; GIBSON, D. M. **Extracellular phytase (EC 3.1. 3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization.** Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 17, 63–91, 1987.

USHASREE, M.V.; SUMAYYA, H.B.V.S.; PANDEY, A. **Adopting structural elements from intrinsically stable phytase – a promising strategy towards thermostable phytases.** Indian Journal of Biotechnology, v. 10, p. 458-467, 2011.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. **Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource.** New Phytologist, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; BRAVO, V.; FERNANDEZ-SERRANO, M.; NIKOLAEVA, I. **Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes.** Industrial Crops and Products, v. 26, p. 332- 336, 2007.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. **Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs.** Process Biochemistry, v. 38, 211-217, 2002.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview.** Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p. 3-14, 2004.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. **Phytase production by the unconventional yeast *Pichia anomala* in fed batch and cyclic fed batch fermentations.** African Journal of Biotechnology, v. 11, p. 13705-13709, 2012.

VIAL, C. H.; PONCIN, S.; WILD, G.; MIDOUX, N. **Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor.** Chemical Engineering Science, v. 57, n. 22, p. 4745-4762, 2002.

VIEIRA, I. M.; ROCHA, M. H.; CUNHA, E. B. KADOWAKI, M. K. OSAKU, C. A. **Basidiomicetos da cidade de Cascavel – Oeste do Paraná – e suas aplicações em biotecnologia.** Estud. Biol., v. 28, n. 65, p. 21-31, 2006.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. **Phytases: microbial Sources, production, purification, and potential biotechnological applications.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 23, p.29, 2003.

VOHRA A, KAUR P, SATYANARAYANA T. **Production, characteristics and applications of the cell-bound phytase of *Pichia anomala*.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 99, n. 1, 51-55, 2011.

VOLFOVÁ, O.; DVORÁKOVÁ, J.; HANZLÍKOVÁ, A.; JANDERA, A. **Phytase from *Aspergillus niger***. Folia Microbiologica, v. 39, n. 6, p. 481-484, 1994.

VUOLANTO, A.; VON WEYMARN, N.; KEROVUO, J.; OJAMO, H.; LEISOLA, M. **Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis***. Biotechnology Letters, v. 23, p. 761–766, 2001.

WANG, W. **Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals**. International Journal Pharmaceutics, v. 185, p. 129–188, 1999.

WANG, X-C.; XI, R-J.; LI, Y.; D-M, WANG.; YAO, Y-J. **The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China**. A Plos One, v. 7, n. 7, 2012.

WEIJERS, S. R.; RIET, K. V. **Enzyme stability in downstream processing. Part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization**. Biotechnology Advances, v. 10, p. 237-249, 1992.

WILLIAMS, S. G. **The role of phytic acid in the wheat grain**. Plant Physiology, v. 45, p. 376-381, 1970.

WINTERS, M.A.; DEBENEDETTI, P.G.; CAREY, J.; SPARKS, H.G.; SANE, S.U.; PRZYBYCIEN, T.D. **Long-term and high temperature storage of supercritically-processed microparticulate protein powders**. Pharmaceutical Research, v. 14, n.10, p.1370-1380, 1997.

WODZINSKI, R.J.; ULLAH, A.H. **Phytase**. Advances Applied Microbiology, v. 42, p. 263-302, 1996.

WORLD POULTRY. **Research reveals poultry feed economic potential**. Disponível em:
<http://www.worldpoultry.net/Broilers/Nutrition/2014/3/Research-reveals-poultry-feed-economic-potential-1482865W/>. Acesso em: 9 jun. 2014.

YADAV, R.S.; TARAFDAR, J.C. **Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds**. Soil Biology and Biochemistry, v. 35, n. 6, p. 745–751, 2003.

YANG, H. ZHANG, L. **Changes in some components of soymilk during fermentation with the basidiomycete *Ganoderma lucidum***. Food Chemistry, v. 112, p. 1–5, 2009.

YAMAGATA, H.; TANAKA, K.; KASAI, Z. **Isoenzymes of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains and their interconversions**. Agricultural and Biological Chemistry, v. 43, p. 2059, 1979.

YEO, G. **Companion animals – any interest?** International Phytase Summit, Roma, 2012.

XU, L.; ZHANG, G.; WANG, H.; NG, T.B. **Purification and characterization of phytase with a wide pH adaptation from common edible mushroom *Volvariella volvacea* (Straw mushroom).** Indian Journal Biochemistry Biophysics, v. 49, p. 49-54, 2012.

ZHANG, G-Q.; WU, Y-Y.; NG, T-B, CHEN, Q-J.; WANG, H-X. **A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake Mushroom *Lentinus edodes*.** BioMed Research International, v. 2013, ID 540239, p. 7, 2013a.

ZHANG, G-Q.; CHEN, Q-J.; SUN, J.; WANG, H-X.; HAN, C-H. **Purification and characterization of a novel acid phosphatase from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*.** Journal Basic Microbiology, v. 53, p. 1–8, 2013b.

ZHANG, Z.; SHEN, LIU, W. D.; LI, J. **Enhanced production of mycelial biomass and ganoderic acid in submerged culture of *Ganoderma applanatum* ACCC-52297 elicited by feeding rutin.** African Journal of Microbiology Research, v. 5, n. 21, p. 3452-3461, 2011.

ZHANG, L.; WANG, Y.; ZHANG, C.; WANG, Y.; ZHU, D.; WANG, C.; NAGATA, S. **Supplementation Effect of Ectoine on Thermostability of Phytase.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 102, n. 6, p. 560-563, 2006.

ZHENG, X.; WU, D.; LI, Z.; CHEN, J.; WU, J. **Enhanced storage stability of recombinant enzyme preparation of alpha-CGTase from *Paenibacillus macerans* by chemical additives.** Chinese Journal of Biotechnology, v. 27, p. 185-95, 2011.

ZHU, M.J.; WANG, H.X.; Ng, T.B. **Purification and identification of a phytase from fruiting bodies of the winter mushroom, *Flammulina velutipes*, African Journal of Biotechnology**, vol. 10, p. 17845–17852, 2011.**No index entries found.**

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As análises morfológicas e moleculares permitiram identificar o gênero do basidiomiceto *Ganoderma* sp. MR-56;
- A otimização do bioprocesso de produção da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 por cultivo submerso utilizando extrato de farelo de 20% (m/v) trigo tratado, realizado em 2 etapas permitiu aumento considerável na produção da enzima;
- Em estudos com diferentes biorreatores, pode-se evidenciar a maior síntese de fitase em frascos tipo Dreschel com aeração forçada com um aumento expressivo de fitase em comparação com frascos de Erlenmeyer e biorreator de tanque agitado;
- Concentração da enzima foi possível com precipitação com sal, solvente orgânico e ultrafiltração;
- A separação da enzima não foi efetiva pelos métodos cromatográficos utilizados;
- Através do zimograma da fitase estimou-se que é uma molécula de elevada massa molecular;
- A fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 apresentou termoestabilidade à temperaturas elevadas para aplicação em processamentos de alimentos e ração animal;
- O estudo de aditivos para a formulação do produto líquido de fitase contém um antimicrobiano e um antioxidante, o qual apresentou 100% de estabilidade em condições aceleradas por 15 dias de armazenamento;
- O produto formulado em pó foi microencapsulado com polímeros e o E2 mostrou maior estabilidade à temperatura ambiente;
- Novas formulações de fitase foram desenvolvidas como alternativa ao mercado de enzimas.

3.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar outras regiões ITS do DNA ribossomal do *Ganoderma* sp.;
- Estudar estratégias cromatográficas sequenciais visando purificar e identificar as fitases de *Ganoderma* sp. MR-56;
- Realizar a expressão do gene da fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 em outro micro-organismo hospedeiro para o aumento da produção da enzima;
- Escalonar o processo de cultivo submerso otimizado em frascos do tipo Dreschel com aeração forçada;
- Realizar estudos de estabilidade térmica da fitase incubada à diferentes temperaturas de peletização;
- Realizar testes de aplicação do produto formulado em ração animal e em alimentos para consumo humano.

ANEXO

O artigo publicado intitulado “*Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by Ganoderma applanatum* MR-56. Fungal biology, v. 11, p. 655-662, 2014” refere-se à participação como pesquisadora visitante no projeto BIOASSORT (318931), na Universidade de Nápoles “*Federico II*” no grupo de Biotecnologia Industrial, Ambiental e Molecular (*BIMA Group*). Esta pesquisa foi financiada pela *European Commission Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme within the 7th European Community Framework Programme*. Título do projeto “*Improvement of technologies and tools, e.g. biosystems and biocatalysts, for waste conversion to develop an assortment of high added value eco-friendly and cost-effective bio-products*”.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56

Denise Naomi Xavier SALMON^a, Michele Rigon SPIER^a,
Carlos Ricardo SOCCOL^a, Luciana Porto de Souza VANDENBERGHE^a,
Valesca WEINGARTNER MONTIBELLER^a, Mário César Jucoski BIER^a,
Vincenza FARACO^{b,*}

^aDepartment of Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, Coronel Francisco H. dos Santos Avenue, 210, 81531-990 Curitiba, Brazil

^bDepartment of Chemical Sciences, University of Naples “Federico II”, Complesso Universitario Monte S. Angelo, via Cintia 4, 80126 Naples, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 August 2013

Received in revised form

1 April 2014

Accepted 7 April 2014

Available online 24 April 2014

Corresponding Editor:

Anna Rosling

Keywords:

Carboxymethylcellulose

Cellulose

Induction

Xylan

Xylose

ABSTRACT

This manuscript describes the analysis of the effect of cellulose, carboxymethylcellulose (CMC), xylan, and xylose as inducers of cellulase and xylanase activity production by *Ganoderma applanatum* MR-56 and the optimization of their production in liquid cultures by statistical methods. The Plackett–Burman screening design was applied to identify the most significant inducers of xylanase and cellulase activities production by *G. applanatum* MR-56. The most significant effect on xylanase and cellulase activities production was exercised by cellulose, even if xylose and CMC were also effective at some times. The combined effect of cellulose, yeast extract, and pH was analyzed by a 2³ factorial experimental design with four central points that showed that the maximum tested cellulose (1 % w/v) and yeast extract (5 g L⁻¹) concentrations gave the maximum production of xylanase (8.24 U mL⁻¹) and cellulase (3.29 U mL⁻¹) activity at pH 6 and 4, respectively. These values achieved for cellulase and xylanase activity represent 12–25 fold and 36 fold higher values than the maximum so far reported for other strains of *G. applanatum*, respectively.

© 2014 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. Open access under

[CC BY-NC-ND license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

The fungus *Ganoderma applanatum* is a widely distributed wood-decaying Basidiomycete (Dinis *et al.* 2009). Species of *Ganoderma* are important wood decay fungi occurring on conifers, hardwoods throughout the world (Elisashvili *et al.* 2009). They are white-rot fungi with the ability to decay wood from

simultaneous decay to preferential removal of lignin. The most known species of the genus *Ganoderma*, namely *Ganoderma lucidum*, has an array of pharmacological properties for immunomodulatory activity (Russell & Paterson 2006). The increasing demand for enzyme production has enhanced the need for investigating new enzyme sources. In recent years, the potential use of mushrooms as biotechnological

* Corresponding author. Department of Chemical Sciences, University of Naples “Federico II”, Complesso Universitario Monte S. Angelo, via Cintia 4, 80126 Naples, Italy. Tel.: +39 081 674315; fax: +39 081 674313.

E-mail address: vfaraco@unina.it (V. Faraco).

1878-6146 © 2014 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. Open access under [CC BY-NC-ND license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.003>

sources of enzymes has stimulated interest in their exploration.

Bioethanol is the most produced biofuel worldwide with almost 74 billion litres in 2009, EU ranking third behind United States (54 %) and Brazil (34 %), with a production of 3.7 billion litres in 2009 (Soccol et al. 2011). The key step for conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars for fuel ethanol production is represented by the hydrolysis of polysaccharides, resulting from biomass pretreatment, by the enzymes cellulases and hemicellulases. Filamentous fungi are the major source of cellulases and hemicellulases. As far as cellulases are concerned, there are three main enzymatic activities involved in cellulose hydrolysis: (1) endoglucanases (EC 3.2.1.4); (2) exoglucanases, including β -cellobiohydrolases (EC 3.2.1.74) and cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91); and (3) β -glucosidases (EC 3.2.1.21). As far as hemicellulases are concerned, endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) and β -xylosidases (EC 3.2.1.37) are required for degradation of the xylan backbone, while auxiliary enzymes such as α -glucuronidases (EC 3.2.1.1), α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), acetylsterases or acetyl xylan esterases (EC 3.1.1.6) are required to achieve the complete degradation of complex substituted xylans.

One of the main challenges for achieving economical feasibility of lignocellulosic ethanol is reducing the high cost of cellulase and xylanase enzymes for biomass hydrolysis. Research on regulation of cellulase and xylanase genes' expression may be very useful for increasing production of these enzymes in their native producers.

This manuscript describes the analysis of the effect of several compounds known as inducers of cellulase and xylanase production (Amore et al. 2013) on the production of cellulase and xylanase activities by *G. applanatum* and the optimization of their production in liquid cultures by statistical methods.

Material and methods

Microorganism

The Basidiomycete *Ganoderma applanatum* was obtained from the Bioprocesses Engineering and Biotechnology Department culture collection from the Federal University of Paraná (UFPR, Curitiba, Brazil). The strain was maintained through periodic transfer at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) plates after cultivation of mycelial blocks (5 × 5 mm) at 30 °C for 7 d.

Preinoculum

Four mycelial blocks (5 × 5 mm) of *Ganoderma applanatum* were inoculated in 50 mL of a modified Czapek liquid medium consisting of 30 g L⁻¹ glucose, 6 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, and 0.01 g L⁻¹ FeSO₄; pH 6.0, within a 100 mL flask. The fungus was incubated in a shaker at 150 rpm, 28 °C for 7 d.

Preliminary study of inducers of *Ganoderma applanatum* cellulase and xylanase activities production

The experiments were carried out in multiwells plates containing 1.5 mL of medium and 3 % w/v of filtered pellets of

G. applanatum in each well. The medium consisted of 0.005 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0.00156 g L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 0.0014 g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O g L⁻¹, 0.002 g L⁻¹ CoCl₂, 1.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.15 g L⁻¹ CaCl₂, 0.15 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, and 2.5 g L⁻¹ yeast extract (except in the studies of nitrogen sources) pH 6.0 and 1 % (w/v) of xylan, xylose, cellulose or carboxymethylcellulose (CMC). Different concentrations of cellulose (0.25 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, and 2.5 % (w/v)) were also compared.

Different nitrogen sources (1 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ peptone, and 1 g L⁻¹ ammonium sulphate) were tested using 0.5 and 1 % w/v cellulose as carbon source.

The plates were incubated at 28 °C under 150 rpm of agitation. The supernatant was recovered by centrifugation and analyzed to evaluate the cellulase or xylanase activity. The samples were monitored during 24–168 h of fermentation at intervals of 24 h. All the experiments were performed in triplicates.

Enzymatic activity assays

Xylanase assay

Xylanase activity assay was performed according to Bailey et al. (1992). The reaction mixture consisting of 1.8 mL of a 1.0 % (w/v) suspension of birch-wood xylan in 50 mM sodium citrate at pH 5.3 and 0.2 mL of enzyme dilution (in 50 mM sodium citrate at pH 5.3) was incubated at 50 °C for 5 min. Released reducing sugars were determined by dinitrosalicylic acid reagent (DNS) method (Miller 1959), by adding 3 mL of DNS solution and then incubating the mixture at 95 °C for 5 min. Absorbance was measured at 540 nm. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme catalyzing the release of 1 μ mol of xylose equivalent per minute.

Azo-CMC assay

Endo-1,4-beta-glucanase activity produced in liquid culture was assayed using Azo-CMC (Megazyme, Ireland) as substrate, following supplier's instructions.

Statistical analysis

The inducers xylan, xylose, cellulose, and CMC were tested using Surface Response Methodology (SRM) as the strategy for optimizing cellulases and xylanases production adopting inducers. The experimental designs are presented below. The matrixes of Plackett–Burman (PB) factorial design and 2³ factorial experimental design were obtained by the Statistica 5.0 software (Statsoft Inc., 2008). The data collected were also analyzed in the same software. Analysis of variance (ANOVA) of data and graphics was also generated by the software. ANOVA table consists of calculations that provide information about levels of variability within a regression model and form a basis for tests of significance.

PB factorial design for evaluation of the most significant inducers

Based on PB 11/12 factorial design, each variable was examined at two levels: -1 for low level and +1 for high level

(Supplementary Table 1). The factors used at the PB were 1 % (w/v) xylan, 1 % (w/v) xylose, 1 % (w/v) cellulose, and 1 % (w/v) CMC and D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, D₆, and D₇ represent dummy factors (Supplementary Table 2) (Plackett & Burman 1946).

2³ Factorial experimental design

The influence of the factors cellulose, yeast extract, and pH (Supplementary Table 3) on xylanase and cellulase activities production was evaluated performing a 2³ factorial experimental design with eight experiments and four central points totaling 12 runs.

Validation of model generated by optimization

After achieving the data in a model of 2³ factorial experimental design, complementary experiments (in triplicate) were performed in Erlenmeyer flasks of 100 mL containing 50 mL of medium and 3 % of preinoculum. The medium consisted of 0.005 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0.00156 g L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 0.0014 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O g L⁻¹, 0.002 g L⁻¹ CoCl₂, 1.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.15 g L⁻¹ CaCl₂, 0.15 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, at 28 °C and 150 rpm of agitation. The conditions tested for validation were the optimal conditions obtained after the optimization strategy: 1 % w/v cellulose and 5 g L⁻¹ of yeast extract at pH 6.0 for xylanase activity production, 1 % w/v cellulose and 5 g L⁻¹ of yeast extract at pH 4 for cellulase activity production. Then, the variables responses achieved experimentally were compared to the responses obtained theoretically using the model generated by the factorial design. If the results (experimental and theoretical) do not differ significantly ($p < 0.05$), then the model may be validated.

Results

Analysis of inducers of *Ganoderma applanatum* LPB MR-56 cellulase and xylanase activities production

A preliminary screening of the potential inducers – xylan, xylose, cellulose, and CMC – of cellulase and xylanase activities production by *G. applanatum* LPB MR-56 was performed in multiwell microplates. It revealed the effect of cellulose and CMC as inducers of xylanase (Fig 1A) and cellulase (Fig 1B) activities production.

The effect of different concentrations of cellulose was also tested (Fig 2), showing that a similar maximum value was achieved with 0.25, 0.5, and 1 % w/v cellulose for both xylanase (Fig 2A) and cellulase activities production (Fig 2B).

Different nitrogen sources (yeast extract, peptone, and ammonium sulphate) were tested using 0.5 and 1 % w/v cellulose as carbon source (Fig 3). These experiments showed that the best nitrogen source for xylanase and cellulase activities production depends on the concentration of cellulose used. As a matter of fact, for xylanase activity production, yeast extract was revealed to be the best nitrogen source when using 1 % w/v cellulose whilst peptone was the best nitrogen source when using 0.5 % w/v cellulose. The opposite behaviour was exhibited by these nitrogen sources for cellulase activity production in the presence of 0.5 % w/v or 1 % w/v cellulose.

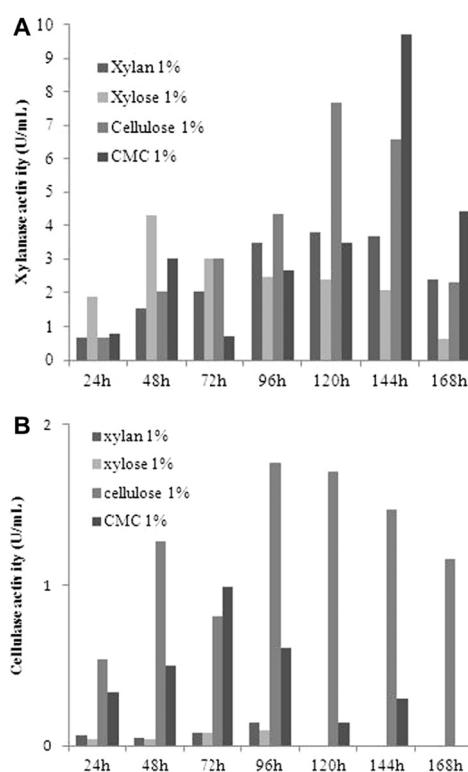


Fig 1 – Effect of different compounds – 1 % xylan, 1 % xylose, 1 % cellulose, 1 % CMC – on xylanase (A) and cellulase (B) activities production by *G. applanatum* LPB MR-56 in liquid culture in multiwell microplates.

The observed effect of cellulose concentration can be due to the different C:N ratios in medium that affects fungal growth and metabolism thus also affecting the enzyme production.

Screening of inducers affecting xylanase and cellulase activities production by PB design

The PB screening design was applied to identify the most significant inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56 in liquid culture. The results of the analysis reported in Table 1 (for xylanase activity production) and Table 2 (for cellulase activity production) showed different patterns at different times.

The Pareto Charts indicating the standardized effects of the inducers on xylanase and cellulase activities production are presented in Figs 4 and 5, respectively. ANOVA data are reported in Supplementary Tables 4 (for xylanase activity production) and 5 (for cellulase activity production).

The most significant inducer effect on xylanase activity production was exercised by cellulose, even if xylose and

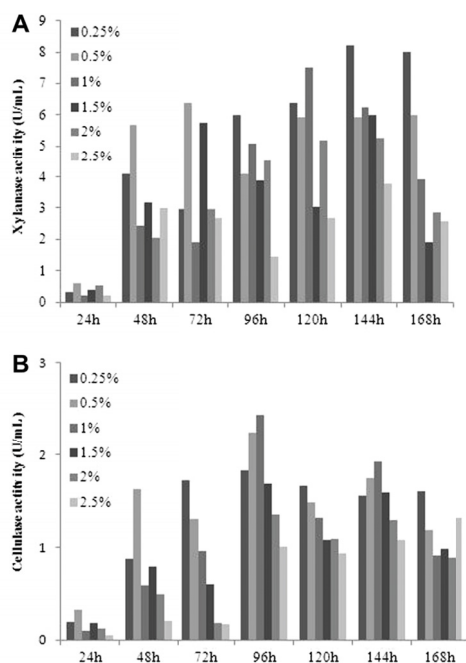


Fig 2 – Effect of different cellulose concentrations – 0.25 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 % – on xylanase (A) and cellulase (B) production by *G. applanatum* LPB MR-56 in liquid culture in multiwell microplates.

CMC were also effective at some times (Supplementary Table 4). At 96 h cellulose represents the best inducer, and, at 120 h, both cellulose and xylose are significant inducers, cellulose being the best one. At 168 h, cellulose is the most significant inducer followed by CMC.

As shown in Fig 4, reporting the Pareto Chart of xylanase activity production at 120 h of fermentation, cellulose showed significance at 95 % of confidence level ($p < 0.05$) with a slight positive effect (effect = +2.32) on xylanase activity production.

The highest inducer effect also on cellulase activity production was performed by cellulose, even if xylose was also effective at some times as reported in Supplementary Table 5. The most statistically significant inducers for cellulase activity production were shown to be different at different times, being (in order of significance when more inducers are revealed) xylose, CMC, and cellulose at 96 h, cellulose and CMC at 168 h.

In Fig 5, the Pareto Chart of cellulase activity production in 96 h of fermentation ($R^2 = 0.83/R^2 \text{ adj.} = 0.77$) is reported showing the significant factors at 95 % of confidence level ($p < 0.05$). Xylose presented a slight negative effect (effect = -1.05) on cellulase production, while cellulose and CMC positively affected cellulase activity production (effect = +0.79 and effect = +0.98, respectively), even their effect were also slight.

Analysis of combined effect of cellulose, yeast extract, and pH on xylanase and cellulase activities production and validation of model generated by the 2^3 factorial experimental design

To analyze the combined effect of cellulose, yeast extract, and pH, a 2^3 factorial experimental design with 12 runs was performed. This analysis for xylanase activity production showed that the maximum cellulose (1 % w/v) and yeast extract (5 g L^{-1}) concentrations gave the maximum activity values, and that the optimal pH value was different at 72 (pH 6) and 96 (pH 4) h (Fig 6A), reaching 8.24 and 5.36 U mL^{-1} , respectively. The ANOVA (Supplementary Table 6) shows the significant variables, adjusts parameters (R^2 and $R^2 \text{ adj.}$) as the p value for xylanase activity production.

For cellulase activity, the best combination was given by the maximum cellulose and yeast extract concentrations and pH 4 (Fig 6B), giving 3.29 U mL^{-1} . Supplementary Table 7 shows the ANOVA for cellulase production, including significant variable, significant interaction, and statistic parameters.

For xylanase activity production in 72 h of fermentation, the model which describes the Surface Response (Fig 6A) is demonstrated by the Eq. (1):

$$\text{Xyl Act. (U mL}^{-1}\text{)} = 2.14 + 0.7605 \cdot \text{CEL} - 0.9695 \cdot \text{pH} + 0.528 \cdot \text{CEL} \cdot \text{pH} \quad (1)$$

where Xyl Act. = xylanase activity (U mL^{-1}); CEL = cellulose (% w/v); pH = pH value.

For cellulase activity production in 96 h of fermentation, the model which describes the Surface Response (Fig 6B) is demonstrated by the Eq. (2):

$$\text{Cel Act. (U mL}^{-1}\text{)} = 1.258 + 0.6105 \cdot \text{CEL} + 0.76025 \cdot \text{YEA} + 0.56 \cdot \text{CEL} \cdot \text{YEA} \quad (2)$$

where Cel Act. = cellulase activity (U mL^{-1}); CEL = cellulose (% w/v); YEA = yeast extract (% w/v).

The evaluation experiments 2^3 factorial design performed at the observed and predicted conditions demonstrated that experimental values were reasonably close to the predicted values confirming the validation and adequacy of the predicted models. The experimental results (average) did not differ significantly ($p < 0.05$) with the theoretical values obtained by the generated model (Supplementary Table 8).

Discussion

The preliminary screening of the potential inducers of cellulase and xylanase activities production performed for *Ganoderma applanatum* LPB MR-56 in multiwell microplates revealed a maximum value for cellulase activity at 96 h in the presence of cellulose of 1.75 U mL^{-1} , representing a 7- and 13-fold higher value than those so far reported for other strains of *G. applanatum* by Salinasa et al. (2011) – around 0.27 U mL^{-1} – and Dinis et al. (2009) – around 0.13 U mL^{-1} , respectively, especially considering that the Azo-CMC assay adopted in this study gives lower values than the CMC assay reported in the manuscripts by Salinasa et al. (2011) and Dinis et al. (2009). The highest xylanase activity values achieved for *G. applanatum* LPB MR-56 at 144 (9.72 U mL^{-1}) and 120 (7.68 U mL^{-1}) h in the presence of

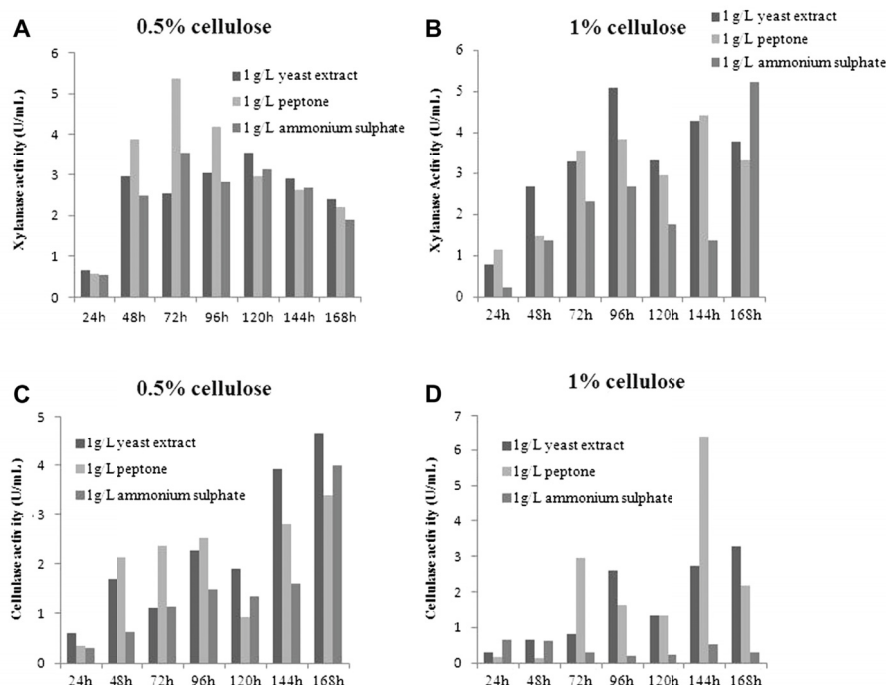


Fig 3 – Effect of different nitrogen sources – 1 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ peptone, 1 g L⁻¹ ammonium sulphate – on xylanase activity production with 0.5 % of cellulose (A), xylanase activity production with 1 % of cellulose (B), cellulase activity production with 0.5 % cellulose (C), and cellulase activity production with 1 % of cellulose (D), by *G. applanatum* LPB MR-56 in liquid culture in multiwell microplates.

CMC and cellulose, respectively, are 42- and 33-fold higher than the maximum (around 0.23 U mL⁻¹) so far reported for another strain of *G. applanatum* (Dinis et al. 2009).

The most significant inducers of xylanase and cellulase activities production by *G. applanatum* LPB MR-56 in liquid culture were then identified by statistical methods. Cellulose revealed to be the best inducer of cellulase activity production but also CMC and xylose were effective in inducing production of this enzymatic activity, coherently with the results reported for other fungi, being cellulose, CMC, and xylose typical inducers of fungal cellulase activity production (Amore et al. 2013; Jourdi et al. 2013). Cellulose caused the highest inductive effect on *G. applanatum* LPB MR-56 xylanase activity production and xylose was also shown able to induce it. Different inducibility of fungal xylanase genes' expression was observed in other fungi. In *Trichoderma reesei*, xylose induces production of XYN1 whilst cellulose induces XYN2 production (Zeilinger et al. 1996). Xylanase activity produced by *Aspergillus phoenicis* is induced by xylan, xylose or beta-methylxyloside (Rizzatti et al. 2008). Altaf et al. (2010) reported that the values of xylanase activity of the basidiomycetes *Flammulina velutipes* and *Pleurotus eryngii* using the inducer xylose were higher than those produced with xylan, both for *F.*

velutipes (5.3 U mL⁻¹ vs 4.36 U mL⁻¹) and *P. eryngii* (6.83 U mL⁻¹ vs 1.26 U mL⁻¹). A different behaviour was observed for hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* whose production level was not increased by xylose (Brienzo et al. 2012). Xylanase activity was produced by *Thermomyces lanuginosus* TISTR 3465 at low level with xylose whilst xylan showed the highest inductive effect on the enzyme formation whereas xylobiose and xyloligosaccharides resulted in lesser effect (Khucharoenphaisan et al. 2010).

The most effective inducers for *G. applanatum* LPB MR-56 xylanase and cellulase activities production were shown to be different at different times that is typical of fungal xylanase and cellulase activities induction (Amore et al. 2013) and can be due to the complex fungal metabolism and its relationship with the changeable conditions in the culture medium over the time.

The combined effects of cellulose, yeast extract, and pH on *G. applanatum* LPB MR-56 xylanase and cellulase activity production was analyzed by a 2³ factorial experimental design with four central points that allowed identifying the conditions that give the maximum production of xylanase (8.24 U mL⁻¹) and cellulase (3.29 U mL⁻¹) activity. The highest xylanase activity level thus achieved represents a 36 fold

Table 1 – PB screening of xylanase inducers.

Run	Xylan	Xylose	Cellulose	CMC	Xylanase activity (U mL ⁻¹)						
					24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
1	1%	0	1%	0	0.109	1.00	3.970	4.393	4.970	2.764	1.801
2	1%	1%	0	1%	0.202	2.10	1.066	0.616	1.466	0.816	0.673
3	0	1%	1%	0	0.109	2.09	2.764	2.987	4.764	2.784	2.393
4	1%	0	1%	1%	0.202	1.05	3.228	2.950	4.228	3.414	1.466
5	1%	1%	0	1%	0.202	2.04	0.730	0.353	2.30	0.724	0.538
6	1%	1%	1%	0	0.109	1.92	2.49	2.31	4.49	3.32	1.96
7	0	1%	1%	1%	0.404	1.52	1.88	2.54	4.37	4.08	1.56
8	0	0	1%	1%	0.202	1.57	4.34	3.47	4.34	2.74	1.07
9	0	0	0	1%	0.202	1.01	0.912	1.37	2.115	1.19	0.588
10	1%	0	0	0	0.109	1.57	1.01	2.15	3.51	3.18	1.59
11	0	1%	0	0	0.219	2.98	1.49	0.909	2.49	0.816	0.622
12	0	0	0	0	0.109	0.745	1.37	1.58	1.37	1.69	0.799
13 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.156	2.31	3.97	3.84	3.97	2.02	2.02
14 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.156	2.64	3.04	3.44	3.04	1.74	1.20
15 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.156	1.61	3.04	3.44	3.04	2.49	1.37
16 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.156	2.40	3.78	3.75	3.78	1.37	1.37
17 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.156	2.40	3.14	3.32	3.14	1.28	1.30

higher value than the maximum so far reported for other strains of *G. applanatum* (Dinis et al. 2009). As far as cellulase activity is concerned, the best combination gave a value of activity representing 12 and 25 fold higher value than the maximum so far reported for other strains of *G. applanatum* by Salinas et al. (2011) and Dinis et al. (2009), respectively.

The estimated effects of the 2³ factorial experimental design showed that for xylanase activity production, at 72 h of fermentation, cellulose (%) and the interaction between cellulose and yeast extract present significant positive effects on xylanase activity production, whilst at 96 h, only the pH was the significant variable, although the pH presented a negative effect (-0.9695) on xylanase activity. It means that if the initial pH value of fermentation tends to values around 4.0 the maximum activity of xylanase would be achieved (Fig 6A).

Cellulose (%) ($p = 0.030$), yeast extract (%) ($p = 0.0148$), and the interaction of these variables cellulose and yeast extract

($p = 0.038$) demonstrated statistical significance ($p < 0.05$) for cellulase activity production. For example, if the concentration of cellulose in the medium composition increases a little more than 1 % w/v, and also for yeast extract, statistical analysis indicated that the cellulase activity production also increases (if considered 96 h of fermentation) (Fig 6B).

The experimental results (average) did not differ significantly ($p < 0.05$) with the theoretical values obtained by the generated model (Supplementary Table 8). Then, the models obtained by 2³ factorial experimental design (shown in Eqs. 1 and 2, respectively) were experimentally validated in this study.

In conclusion, this manuscript allowed identifying for the first time the inducers of cellulase and xylanase activities in *G. applanatum* LPB MR-56, reported an optimization of culture conditions by statistical methods, and showed the ability of this strain to produce cellulase and xylanase activities in

Table 2 – PB screening of cellulase inducers.

Run	Xylan	Xylose	Cellulose	CMC	Cellulase activity (U mL ⁻¹)						
					24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
1	1%	0	1%	0	0.206	0.351	1.50	0.964	1.70	2.29	0.464
2	1%	1%	0	1%	0.297	0.089	0.141	0.105	0.000	0.000	0.000
3	0	1%	1%	0	0.056	0.062	0.096	0.108	0.000	0.115	0.110
4	1%	0	1%	1%	0.351	0.556	1.10	2.93	0.808	1.87	1.05
5	1%	1%	0	1%	0.358	0.083	0.167	0.129	0.000	0.000	0.000
6	1%	1%	1%	0	0.034	0.090	0.186	0.220	0.000	0.907	0.000
7	0	1%	1%	1%	0.303	0.000	1.83	0.847	0.752	1.65	0.202
8	0	0	1%	1%	0.386	0.615	1.60	1.94	0.836	0.000	0.000
9	0	0	0	1%	0.607	1.07	0.558	1.61	0.113	0.045	0.000
10	1%	0	0	0	0.052	0.077	0.098	0.060	0.000	0.000	0.000
11	0	1%	0	0	0.045	0.048	0.083	0.060	0.000	0.000	0.000
12	0	0	0	0	0.034	0.059	0.078	0.257	0.000	0.000	0.000
13 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.142	0.268	0.811	0.884	1.15	1.06	0.000
14 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.070	0.279	0.913	0.471	0.000	0.000	0.000
15 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.044	0.084	0.761	0.522	1.25	0.954	0.000
16 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.269	0.198	0.870	0.844	1.54	1.05	0.000
17 (C)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.038	0.075	0.908	0.852	2.66	1.17	0.000

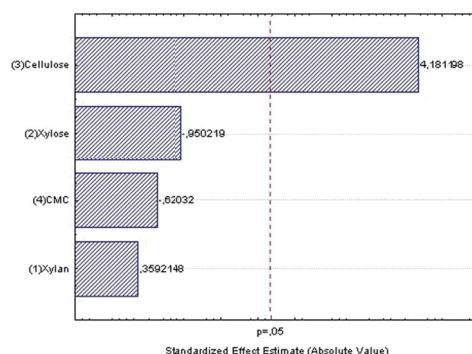


Fig 4 – Pareto Chart of xylanases production in 120 h of fermentation ($R^2 = 0.83/R^2 \text{ adj.} = 0.78$), showing the significant factors at 95 % of confidence level ($p < 0.05$). Effect estimates and p values for factors tested in xylanase activity production. Significant factor ($p < 0.05$) was cellulose ($p = 0.000007$) with a respective effect of +2.32. The factors xylan, xylose, and CMC did not present significative effect ($p < 0.05$) on xylanase activity production.

liquid cultures at higher values than the maximum so far reported for other strains of *G. applanatum*. Moreover, some culture conditions allowed the simultaneous production of both cellulase and xylanase activities representing the ideal scenario for using these enzymes for lignocellulose saccharification aimed at bioethanol production.

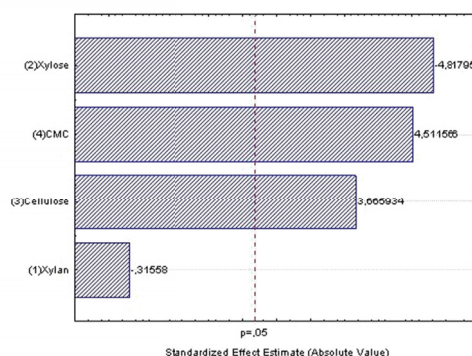


Fig 5 – Pareto Chart of cellulases production in 96 h of fermentation ($R^2 = 0.83/R^2 \text{ adj.} = 0.77$), showing the significant factors at 95 % of confidence level ($p < 0.05$). Effect estimates and p values for factors tested in cellulases production. Significant factors ($p < 0.05$): xylose ($p = 0.000421$), cellulose ($p = 0.003231$), and CMC ($p = 0.000712$) and the respective effects are -1.048, 0.79, and 0.98. The factor xylan did not present effect significative ($p < 0.05$) on cellulase activity production.

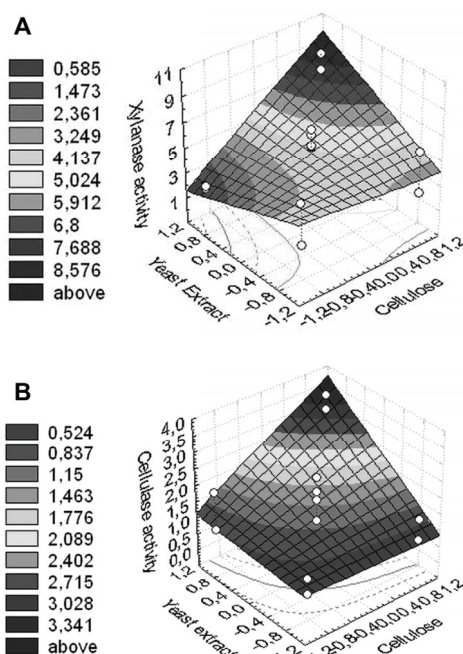


Fig 6 – Surface Response generated by the analysis of the combined effect of cellulose, yeast extract, and pH by a 2^3 factorial experimental design on xylanase (A) and cellulase (B) production in 9 h of fermentation.

These results can contribute to the advancements in developing enzymatic mixtures for cellulose saccharification and ethanol production.

Acknowledgements

This research was supported by a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme: 'Improvement of technologies and tools, e.g. biosystems and biocatalysts, for waste conversion to develop an assortment of high added value eco-friendly and cost-effective bio-products' BIOAS-SORT (grant number 318931). The authors also thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) from Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.003>.

REFERENCES

- Altat SA, Umar DM, Muhammad MS, 2010. Production of xylanase enzyme by *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes* grown on different carbon sources under submerged fermentation. *World Applied Sciences Journal (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering)* 8: 47–49.
- Amore A, Giacobbe S, Faraco V, 2013. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics* 14: 1–20.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K, 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23: 257–270.
- Brienzo M, Montem JR, Milagres AM, 2012. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 113–119.
- Dinis MJ, Bezerr RMF, Nunes F, Dias AA, Guedes CV, Ferreir LMM, Cone JW, Marques GSM, Barros ARN, Rodrigues MAM, 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 100: 4829–4835.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Khardziari T, Agathos SN, 2009. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 331–339.
- Jourdier E, Cohen C, Poughon L, Larroche C, Monot F, Ben Chaabane F, 2013. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. *Biotechnology for Biofuels* 6: 79.
- Khucharoenphaisan K, Tokuyama S, Ratanakhanokchai K, Kitpreechavanich V, 2010. Induction and repression of beta-xylanase of *Thermomyces lanuginosus* TISTR 3465. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 209–215.
- Miller GL, 1959. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Plackett RL, Burman JP, 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33: 305–325.
- Rizzatti AC, Freitas FZ, Bertolini MC, Peixoto-Nogueira SC, Terenzi HF, Jorge JA, Polizeli Mde L, 2008. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. *Journal of Industrial Microbiology* 35: 237–244.
- Russell R, Paterson M, 2006. *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67: 1985–2001.
- Salinas A, Vega M, Lienqueo ME, Garcia A, Carmona R, Salazar O, 2011. Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: heterologous expression of a family 5 glycoside hydrolase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 49: 485–491.
- Soccol CR, Faraco V, Karp S, Vandenberghe LPS, Thomaz-Soccol V, Woiciechowski A, Pandey A, 2011. In: Pandey A, Larroche C (eds), *Lignocellulosic Bioethanol: current status and future perspectives*.
- Zeilinger S, Mach RL, Schindler M, Herzog P, Kubicek CP, 1996. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 25624–25629.